

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН**

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

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Закиян Сурен Минасович**

Новосибирск 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Список использованных сокращений.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Ориджины репликации эукариот.....	12
1.1.1. Процесс инициации репликации на ориджине.....	12
1.1.2. Последовательности ДНК в районах ориджинов репликации.....	14
1.1.3. Методы картирования ориджинов репликации в геномах эукариот.....	17
1.1.3.1. Метод иммунопреципитации хроматина.....	17
1.1.3.2. Метод двумерного гель-электрофореза.....	18
1.1.3.3. Анализ коротких новосинтезированных нитей ДНК.....	20
1.1.3.4. Bubble-trap метод.....	21
1.1.3.5. Картирование точек старта репликации на уровне отдельных нуклеотидов.....	23
1.1.3.6. Метод молекулярного комбинга.....	24
1.1.4. Эффективность ориджинов репликации.....	25
1.1.5. Локализация ориджинов репликации в промоторах генов и их регуляция.....	27
1.1.5.1. Участие комплексов ремоделинга хроматина в регуляции ориджинов репликации.....	28
1.1.5.2. Участие факторов транскрипции в регуляции ориджинов репликации.....	29
1.1.6. Механизмы регуляции ориджинов репликации, расположенных в районах гетерохроматина.....	31
1.1.7. Модификации гистонов в районах ориджинов репликации.....	32
1.1.7.1. Ацетилирование гистонов стимулирует активность ориджинов.....	33
1.1.7.2. Метилирование H4K20 участвует в регуляции лицензирования ориджинов репликации.....	34
1.1.8. Влияние CpG островков и уровня их метилирования на активность ориджинов репликации.....	36
1.1.9. Пространственная организация репликации в ядре. Фокусы репликации.....	37
1.1.10. Ассоциация ориджинов репликации с ядерным матриксом.....	38
1.1.11. Регуляция ориджинов репликации в процессе эмбрионального развития и дифференцировки клеток.....	41
1.1.12. Регуляция временной картины репликации генома. Репликационные домены.....	45
1.2. Центр инактивации X-хромосомы.....	49
1.2.1. Структура центра инактивации X-хромосомы мыши и полевки.....	49
1.2.2. Ориджины репликации центра инактивации X-хромосомы мыши.....	50
1.2.3. Модификации хроматина в центре инактивации X-хромосомы мыши.....	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	59
2.1. Материалы.....	59

2.1.1. Культуральные среды, сыворотки, антибиотики, добавки.....	59
2.1.2. Ферменты	59
2.1.3. Реактивы	59
2.1.4. Растворы и буферы	60
2.1.5. Наборы.....	61
2.2. Объект исследования	61
2.3. Методы	62
2.3.1. Методы работы с клеточными культурами	62
2.3.1.1. Состав культуральных сред и условия культивирования.....	62
2.3.1.2. Замораживание клеток	63
2.3.1.3. Размораживание клеток	63
2.3.2. Получение нсДНК из асинхронно делящейся культуры клеток.....	63
2.3.3. Иммунофлуоресцентное окрашивание ядер клеток	64
2.3.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	65
2.3.5. Вестерн блот-гибридизация.....	65
2.3.6. Иммунопреципитация хроматина (ChIP).....	66
2.3.7. Выделение РНК	69
2.3.8. Синтез кДНК методом обратной транскрипции	69
2.3.9. Подбор праймерных пар	70
2.3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	72
2.3.11. ПЦР в реальном времени	73
2.3.12. Электрофорез ДНК в агарозном геле	74
2.3.13. Выделение фрагментов ДНК из гелей.....	74
2.3.14. Определение нуклеотидной последовательности ДНК.....	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	76
3.1. Картирование ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы самцов полевки <i>M. levis</i>	76
3.1.1. Картирование активных ориджинов репликации методом NSAA в TC клетках, клетках XEN и фибробластах самцов полевки <i>M. levis</i>	76
3.1.2. Локализация сайтов связывания ORC в локусе XIC в фибробластах самцов <i>M. levis</i>	83
3.2. Анализ нуклеотидного состава ориджинов репликации в локусе XIC.....	87
<i>M. levis</i>	87
3.3. Анализ ассоциации ориджинов репликации с G4 мотивами	88
3.4. Статус экспрессии генов в локусе XIC в фибробластах самцов <i>M. levis</i>	91
3.5. Распределение гистона H3 и его варианта H3.3 в локусе XIC <i>M. levis</i>	92
3.6. Модификации хроматина в локусе XIC в фибробластах самцов <i>M. levis</i> . Паттерн ацетилирования H3K9, монометилирования H4K20 и триметилирования H3K27	95
3.7. Сравнение расположения ориджинов репликации в локусах XIC.....	101
<i>M. musculus</i> и <i>M. levis</i>	101

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107

Список использованных сокращений

2D – двумерный;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

кДНК – комплементарная ДНК;

м.п.н. – миллион пар нуклеотидов;

нсДНК – новосинтезированные нити ДНК;

п.н. – пара нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РД – репликационные домены;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов;

ТС клетки – трофобластные стволовые клетки;

ТФ – транскрипционные факторы;

ЭГТА – этиленгликольтетраацетат;

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;

ЭС клетки – эмбриональные стволовые клетки;

ЯМ – ядерный матрикс;

ARS – автономно реплицирующаяся последовательность (autonomously replicating sequence);

BrdU – бромдезоксиуридин;

CDK – циклин-зависимая киназа (cyclin-depended kinase);

CGI – CpG-островки (CpG islands);

ChIP – иммунопреципитация хроматина (chromatin immunoprecipitation);

CHO – культура клеток яичников китайского хомячка (chinese hamster ovary cells);

CldU – хлордезоксиуридин;

CTCF – CCCTC-связывающий фактор (CCCTC-binding factor);

DAPI – 4',6'-диамидино-2-фенилининдол;

DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко (Dullbecco's Modified Eagle Medium);

FBS – эмбриональная бычья сыворотка (fetal bovine serum);

G4 – G-квадруплекс (G-quadruplex);

H3K9 – лизин в девятом положении гистона H3;

H3K14 – лизин в четырнадцатом положении гистона H3;

H3K18 – лизин в восемнадцатом положении гистона H3;

H3K27 – лизин в двадцать седьмом положении гистона H3;

H3K4 – лизин в четвертом положении гистона H3;

H3K36 – лизин в тридцать шестом положении гистона H3;

H4K20 – лизин в двадцатом положении гистона H4;

IdU – йоддезоксисуридин;

LINE – длинный диспергированный ядерный элемент (long interspersed nuclear element);

M/G1 – поздняя M, ранняя G1 фазы;

NSAA – анализ количества новосинтезированных нитей ДНК (nascent strands abundance assay);

ORC – комплекс распознавания ориджина (origin recognition complex);

PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline);

PIC – ингибиторы протеаз (protease inhibition cocktail);

pre-IC – преинициаторный комплекс (pre-initiation complex);

pre-RC – пререпликационный комплекс (pre-replication complex);

SAR/MAR – районы прикрепления к ядерному скаффолду/матриксу (scaffold/matrix attachment regions);

SDS – додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate);

SINE – короткий диспергированный ядерный элемент (short interspersed nuclear element);

TTR – timing transition regions;

XEN – клетки экстраэмбриональной эндодермы (extraembryonic endoderm stem cells);

XIC – центр инактивации X-хромосомы (X-chromosome inactivation center);

ВВЕДЕНИЕ

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.

Цели и задачи исследования

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: ацетилированного H3K9, монометиленного H4K20 и триметиленного 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.

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.

Апробация работы

Результаты работы были представлены

1. **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
2. **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

По теме диссертации опубликованы три работы.

1. **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.
2. **Sherstyuk V.V.**, Shevchenko A.I., Zakian S.M. Epigenetic landscape for initiation of replication // *Chromosoma*. - 2014. - V. 123. - № 3. - P. 183-199.
3. 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.

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.

Благодарности

Работа выполнена в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю С.М. Закияну за поддержку и помощь при выполнении всех этапов настоящего исследования. Автор искренне благодарит А.И. Шевченко, С.В. Павлову, Е.В. Дементьеву и Е.А. Елисафенко за помощь в проведении экспериментов и анализе полученных данных, а также Е.А. Васькову за помощь в работе с клеточными культурами. Автор благодарит Л.А. Васильеву за помощь в статистической обработке данных. Автор благодарен П.П. Лактионову за предоставленную возможность работы с реал-тайм ПЦР амплификатором iQ5, О.Б. Вайнер за помощь в проведении количественной ПЦР, а также всему коллективу лаборатории за дружеское участие и практическую помощь в работе.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Ориджины репликации эукариот

1.1.1. Процесс инициации репликации на ориджине

Инициация репликации на ориджине – это сложный, двухстадийный процесс, в котором участвует множество белков. Ниже описаны события, происходящие при инициации репликации у высших эукариот, в частности у мыши и человека, однако, основные белки, участвующие в процессе инициации репликации в значительной мере консервативны среди эукариот (Bell, Dutta, 2002; DePamphilis, 1999; Sacco *et al.*, 2012; Weinreich *et al.*, 2004). Лицензирование ориджина – первый этап инициации репликации, в ходе которого формируется пререпликационный комплекс (pre-RC: pre-replication complex) (Diffley *et al.*, 1994). Лицензирование происходит в поздней М и ранней G1 фазах (M/G1) (Mendez, Stillman, 2000). Основные компоненты pre-RC: шестисубъединичный комплекс распознавания ориджина (ORC: origin recognition complex), факторы лицензирования ориджина CDT1 и CDC6, а также комплекс MCM2-7, имеющий геликазную активность. Субъединицы ORC1-5, CDC6 и MCM2-7 имеют АТФазную активность и принадлежат к семейству AAA⁺. В первую очередь происходит связывания ORC с ориджином. У дрожжей ORC остается связан с ориджином в ходе всего клеточного цикла, в то время как у высших эукариот ORC диссоциирует из хроматина в S фазе и связывается снова в M/G1 (Kreitz *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012; Tatsumi *et al.*, 2003). Затем происходит связывание CDC6, опосредованное ORC1, и CDT1 (Saha *et al.*, 1998). CDC6 вместе с CDT1 способствуют связыванию MCM2-7, что завершает формирование pre-RC (Cook *et al.*, 2004) (Рисунок 1 А). Кроме того, в процессе лицензирования ориджинов репликации участвуют следующие белки: ORCA, HBO1, MCM8, MCM9, Геминин. ORCA содержит лейцин богатые и WD40 повторы и способствует связыванию ORC с хроматином (Shen *et al.*, 2010). Было показано, что в его отсутствие происходит нарушение формирования pre-RC и остановка клеток в G1 фазе. MCM8 взаимодействует с ORC2 и CDC6 и участвует в связывании CDC6 с хроматином (Volkening *et al.*, 2005). MCM9 и Геминин антагонисты, осуществляющие регуляцию связывания CDT1 с MCM2-7 (Lutzmann *et al.*, 2005; McGarry, Kirschner, 1998;

Yoshida, 2005). Геминин формирует комплекс с CDT1, тем самым ингибируя связывание CDT1 с MCM2-7 (Lutzman *et al.*, 2006). Накапливаясь в клетке в S и G2 фазах, Геминин регулирует лицензирование ориджинов вне фаз M и G1 и предотвращает ререпликацию ДНК. MCM9, в свою очередь, связываясь с CDT1 в G1 фазе, ограничивает количество связанного Геминина с CDT1 и способствует посадке MCM2-7 на ориджин (Lutzman, Mechali, 2008). HBO1 – это гистонацетилтрансфераза, которая связывается с ORC и CDT1 и способствует связыванию MCM2-7 с ориджином репликации (Miotto, Struhl, 2008). Также в регуляции формирования pre-RC участвуют циклин-зависимые киназы (CDK: cyclin-dependent kinases) (Diffley, 2004).

Следующим этапом – формирование преинициаторного комплекса (pre-IC: pre-initiation complex) и активация ориджина, происходящие в S фазе. В первую очередь, CDK и DBF4-зависимые киназы фосфорилируют MCM2-7 (Bochman, Schwacha, 2009; Labib, 2010). Затем с ориджином связывается CDC45 при участии белков MCM10, Треслин, GEMC1, DUE-B, а также происходит связывание белка TopBP1, ответственного впоследствии за связывание ДНК-полимеразы ϵ (Balestrini *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2010; Jeon *et al.*, 2007; Kumagai *et al.*, 2010; Wohlschlegel *et al.*, 2002; Zou, Stillman, 2000). Далее белки CTF4 и RecQL4 связываются с ориджином и привлекают комплекс GINS, состоящий из четырех субъединиц: SLD5, PSF1, PSF2, PSF3 (Im *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2013; Kubota *et al.*, 2003; Takayama *et al.*, 2003). Связывание RecQL4 опосредовано MCM10 (Xu *et al.*, 2009). MCM2-7, CDC45 и GINS формируют CMG комплекс, который представляет собой активную форму геликазы (Aparicio *et al.*, 2009; Kanemaki, Labib, 2006; Moyer *et al.*, 2006; Расек, Walter, 2004) (Рисунок 1 Б). Затем при участии CMG комплекса и RecQL4 осуществляется плавление нитей ДНК, после чего с ориджином связывается ДНК-полимераза α , которая обладает праймазной активностью, белок RPA, который поддерживает ДНК в одноцепочечном состоянии, белок RFC, осуществляющий посадку PCNA – фактора процессивности ДНК-полимераз δ и ϵ , а также ДНК-полимеразы δ и ϵ , в результате чего начинается синтез новых цепей ДНК (Johansson, Macneill, 2010; Sacco *et al.*, 2012).

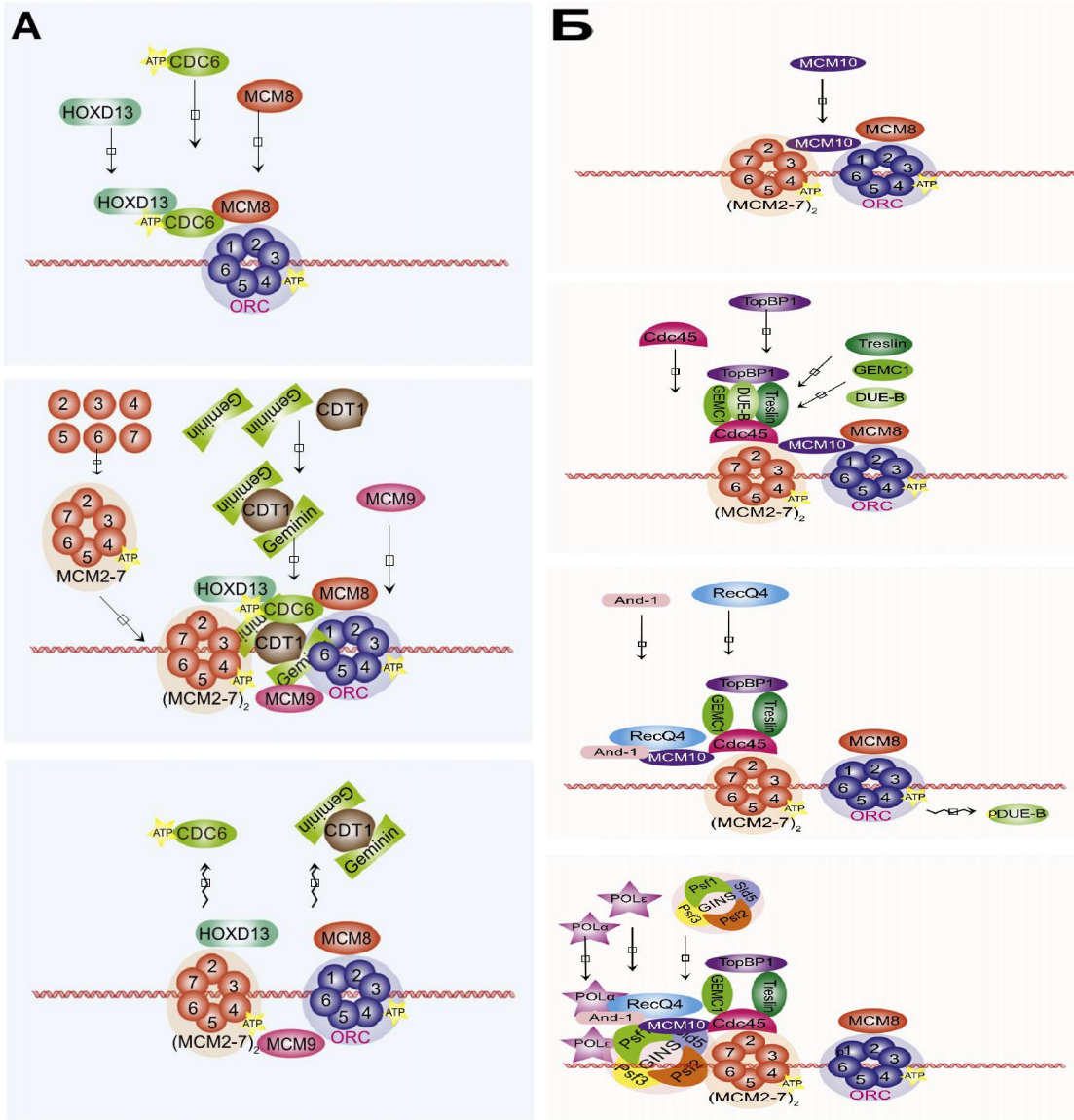


Рисунок 1. Схематичное изображение процессов (А) лицензирования и (Б) инициации ориджина репликации (Sacco *et al.*, 2012).

1.1.2. Последовательности ДНК в районах ориджин репликации

Одним из факторов, определяющих расположение ориджин в геноме, может быть последовательность ДНК с характерными свойствами. Геном прокариот содержит, как правило, один ориджин репликации, имеющий АТ-богатую консенсусную последовательность (Gao, Zhang, 2007). Однако, у эукариот консенсусная последовательность, характеризующая ориджины, была выявлена только у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Автономно реплицирующаяся последовательность (ARS: autonomously replicating sequence), состоящая из 11 пар нуклеотидов представляет собой основной элемент ориджин репликации у *S.*

cerevisiae (Broach *et al.*, 1983; Breier *et al.*, 2004). Известно, что геном *S. cerevisiae* содержит около 12,000 ARS, но для инициации репликации используется всего лишь около 400 ориджинов (Breier *et al.*, 2004). У других эукариот консенсусная последовательность ориджинов репликации не выявлена и, по всей видимости, отсутствует. Однако, у ряда организмов ориджины имеют тенденцию располагаться в районах с определенным нуклеотидным составом ДНК. К примеру, ориджины репликации дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* и *Schizosaccharomyces octosporus* располагаются в районах богатых СТ-динуклеотидами и poly(dA)–poly(dT) трактами (Okuno *et al.*, 1999; Segurado *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2012). В отличие от них, ориджины репликации дрожжей *Schizosaccharomyces japonicus* ассоциированы с poly(dG) и СТСГТС мотивами, а также сайтами связывания белка SAP1 (Xu *et al.*, 2012). У дрожжей *Pichia pastoris* было выявлено два типа ориджинов репликации, которые располагаются в АТ- и GC-богатых районах (Liachko *et al.*, 2014). У некоторых многоклеточных, как в случае с *Xenopus laevis* и *Drosophila melanogaster*, ориджины расположены преимущественно в АТ-богатых участках ДНК (MacAlpine *et al.*, 2004, 2010; Stanojčić *et al.*, 2008). У млекопитающих же дела обстоят несколько сложнее. Было показано, что ORC человека связывается с различными районами эписомного вектора *in vivo*, вне зависимости от последовательности ДНК (Schaarschmidt *et al.*, 2004). В другом эксперименте, проведенном *in vitro*, ORC предпочтительнее связывался с АТ-богатыми участками ДНК (Vashee *et al.*, 2003). Некоторые ориджины в геноме млекопитающих содержат АТ-богатые участки ДНК, которые влияют на их активность (Altman, Fanning, 2004; Liu *et al.*, 2003; Paixao *et al.*, 2004). В одном из полногеномных исследований выявлено, что ориджины человека содержат АТ-богатые районы (Karnani *et al.*, 2010). Предположительно, АТ-богатый участок необходим для облегчения плавления нитей ДНК в процессе инициации репликации. Тем не менее, в ряде работ показано, что многие ориджины репликации млекопитающих ассоциированы с CpG-островками (CGI: CpG islands) – протяженными GC-богатыми районами, обогащенными CpG-динуклеотидами (Besnard *et al.*, 2012; Brylawski *et al.*, 2007; Chastain *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 2002; Paixao *et al.*, 2004; Sequeira-Mendes *et al.*, 2009). Однако, Besnard с соавторами (Besnard *et al.*, 2012) в работе по полногеномному картированию ориджинов в клетках человека считают, что ассоциация ориджинов репликации с

CGI – это частный случай расположения ориджинов репликации вблизи G-богатых районов. Известно, что G-богатые районы ДНК со специфическим мотивом ($G_3N_{1-15}G_3N_{1-15}G_3$) могут формировать четырехцепочечные структуры с петлями различной длины, и называются G-квадруплексами (G4: G-quadruplex) (Рисунок 2) (Huppert, Balasubramanian, 2005). Участки ДНК, содержащие G4 мотивы, зачастую ассоциированы с промоторами, районами с низкой нуклеосомной плотностью, CGI и участвуют в регуляции экспрессии генов человека (Eddy, Maizels, 2009; Halder *et al.*, 2009, 2010). В полногеномных исследованиях ориджинов репликации мыши и человека было установлено, что около 70% ориджинов в геноме мыши и 90% – в геноме человека ассоциированы с G4 мотивами (Besnard *et al.*, 2012; Cayrou *et al.*, 2012). Кроме того, ассоциация ориджинов и G4 мотивов была также обнаружена у *D. melanogaster* (Cayrou *et al.*, 2012).

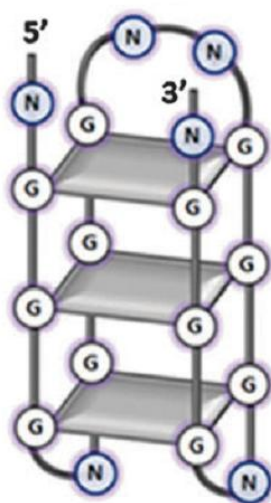


Рисунок 2. Схематичное изображение G-квадруплекса (Baral *et al.*, 2013). N – любой нуклеотид.

В недавнем исследовании по изучению связывания ORC человека с различными последовательностями ДНК и РНК *in vitro* показано, что ORC преимущественно связывается с РНК и одноцепочечными участками ДНК, содержащими G4 мотив (Hoshina *et al.*, 2013). Кроме того, ранее уже было показано связывание ORC с G-богатыми участками РНК (Norseen *et al.*, 2008). Тем не менее, участие G4 мотивов и структур в регуляции ориджинов репликации у млекопитающих остается спорным и малоизученным. Основным аргументом против высокого уровня корреляции расположения ориджинов и G4 мотивов – устойчивость GC-богатых участков ДНК к гидролизу λ -эксонуклеазой, которая используется при картировании ориджинов (Conroy *et al.*, 2010; Perkins *et al.*, 2003).

Вероятно, некоторые ориджины, обнаруженные в полногеномных исследованиях, могут представлять G-богатые участки ДНК, не гидролизованные λ -экзонуклеазой. Кроме того, при использовании другого метода картирования ориджинов в геноме человека, значимого уровня ассоциации с G4 мотивами обнаружено не было (Mesner *et al.*, 2013). Таким образом, роль G4 мотивов в качестве универсальной характеристики ориджинов репликации млекопитающих требует дальнейшего, более подробного изучения.

1.1.3. Методы картирования ориджинов репликации в геномах эукариот

На сегодняшний день существует ряд методов поиска ориджинов репликации в геноме. В целом, их можно разделить на две группы, которые основаны на поиске районов связывания белков, участвующих в процессе инициации репликации, в частности компонентов pre-RC, и детекции реплицирующейся ДНК в геноме.

1.1.3.1. Метод иммунопреципитации хроматина

Поиск участков связывания pre-RC основан на методе иммунопреципитации хроматина (ChIP: chromatin immunoprecipitation) с использованием антител против компонентов ORC, либо комплекса MCM2-7 (Lubelsky *et al.*, 2012). В первую очередь производится обработка клеток раствором формальдегида для “сшивки” ДНК и белков. Затем хроматин фрагментируется обработкой ультразвуком. Далее проводят преципитацию с использованием специфических антител к определенному белку. Затем следует отмывка не связавшихся фрагментов хроматина и очистка целевой ДНК (Рисунок 3). В дальнейшем полученные целевые фрагменты ДНК анализируют с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), метода микрочипов или полногеномного секвенирования. С помощью ПЦР можно определить связывание данных белков в конкретном локусе, в то время как методы, основанные на микрочипах и полногеномном секвенировании, дают возможность проводить полногеномный анализ. Таким образом сайты связывания ORC были прокартированы в геномах *S. cerevisiae* (Wyrick *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006), *D. melanogaster* (Eaton *et al.*, 2011; MacAlpine *et al.*, 2010) и человека (Dellino *et al.*,

2012). Стоит отметить, что провести полногеномный анализ сайтов связывания ORC у человека исследователям удалось лишь относительно недавно за счет модификации метода получения хроматина для иммунопреципитации. Основная сложность анализа ДНК, полученной в ходе ChIP с использованием антител против компонентов ORC, у млекопитающих состоит в низком соотношении сигнал-шум (Schepers, Parior, 2010). Картирование сайтов связывания ORC позволяет выявить все потенциальные ориджины репликации, однако, оно не дает информации об их активности. Кроме того, основной недостаток данного метода поиска ориджинов – это участие ORC в других процессах, кроме репликации, в частности, в формировании гетерохроматина и связывании когезинов с ДНК (Pak *et al.*, 1997; Prasanth *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2004).

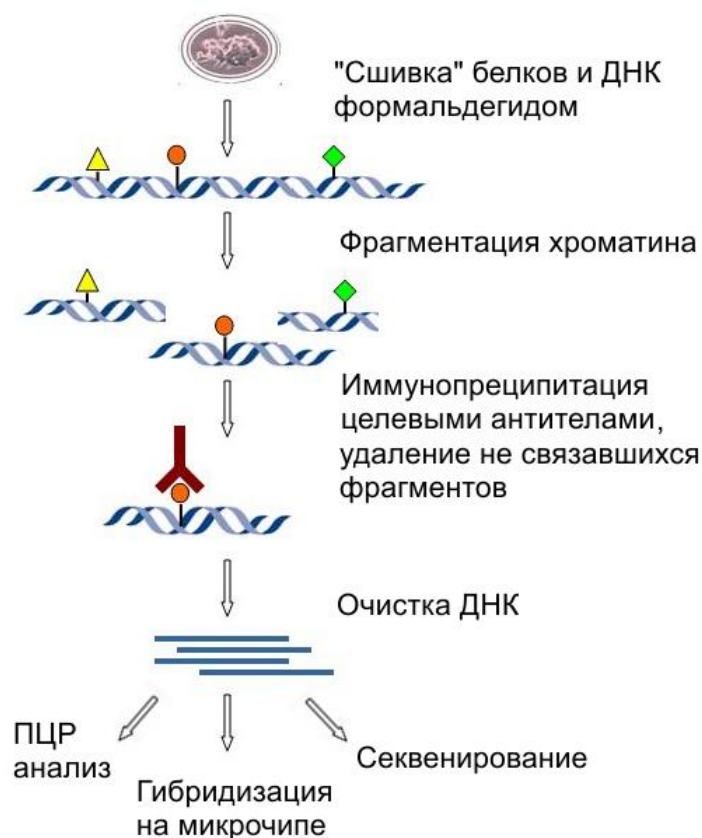


Рисунок 3. Принцип метода иммунопреципитации хроматина (рисунок взят с сайта www.compbio.pbworks.com). Пояснения даны в тексте.

1.1.3.2. Метод двумерного гель-электрофореза

Другой и при этом достаточно большой группой методов поиска ориджинов репликации – детекция реплицирующейся ДНК в районе ориджинов. Один из таких методов – это двумерный (2D) гель-электрофорез (Dijkwel, Hamlin, 1999). Существует два типа 2D гель-электрофореза, используемых для картирования

ориджинов репликации: нейтральный/нейтральный и нейтральный/щелочной. При применении обоих методов, в первую очередь, проводят гидролиз анализируемого участка ДНК эндонуклеазами рестрикции. Затем проводят разделение фрагментов ДНК в первом направлении по молекулярной массе. В случае нейтрального/нейтрального 2D гель-электрофореза во втором направлении проводят разделение по пространственной структуре. В результате формируется специфический паттерн в зависимости от присутствия одной или двух вилок репликации, или пузыря репликации (Рисунок 4 А-Г). В случае нейтрального/щелочного 2D гель-электрофореза во втором направлении происходит денатурация ДНК и миграция новосинтезированных нитей ДНК (нсДНК) в зависимости от размера, что также формирует специфический паттерн (Рисунок 4 Б). Детекцию фрагментов ДНК проводят методом Саузерн-блот гибридизации.

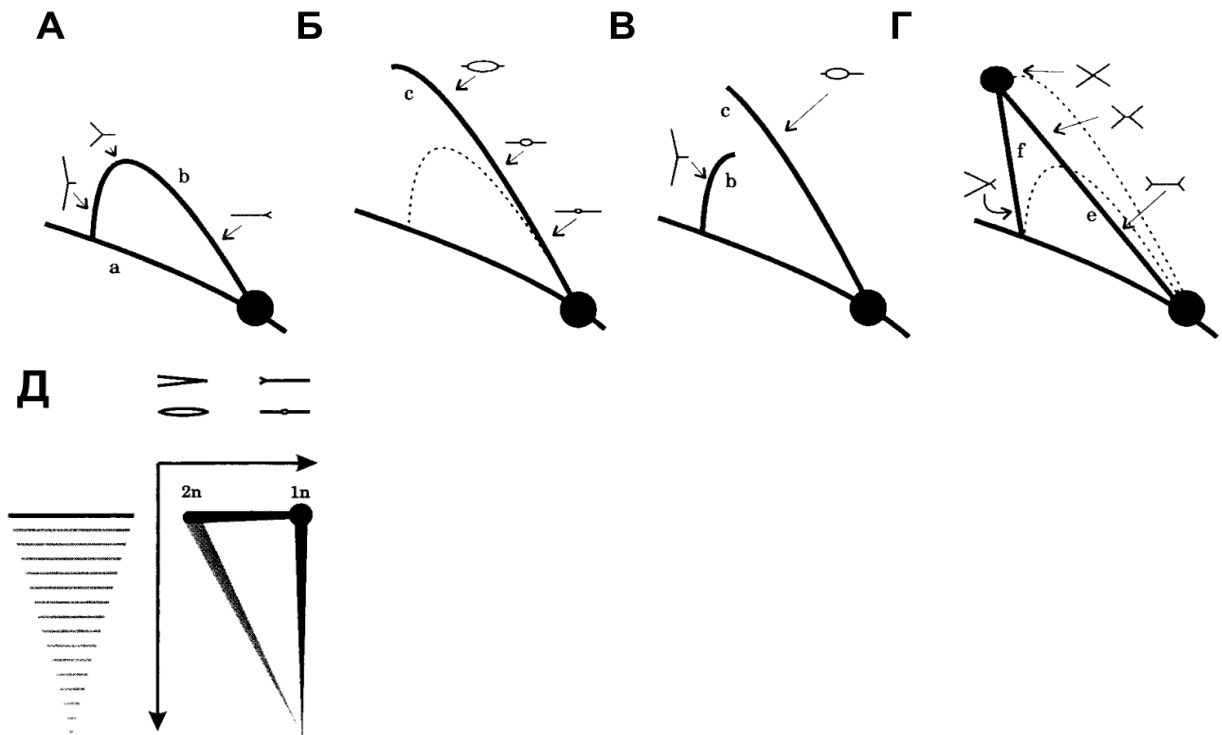


Рисунок 4. Принцип метода 2D гель-электрофореза (Dijkwel, Hamlin, 1999).

(А-Г). Паттерн, полученный в результате саузерн блот-гибридизации после проведения нейтрального/нейтрального 2D гель-электрофореза. (А). Кривая (а) соответствует миграции линейных фрагментов. Кривая (b) получена в результате миграции фрагментов, содержащих вилку репликации. (Б). Кривая (с) соответствует миграции фрагментов, содержащих в центре пузырь репликации. (В). Данный паттерн миграции образуется, если ориджин репликации расположен вблизи от сайта рестрикции. (Г). Кривые (f) и (e) образуют фрагменты, содержащие две вилки репликации, что соответствует терминции репликации. (Д). Схематичный паттерн миграции фрагментов ДНК при нейтральном/щелочном 2D гель-электрофорезе, 1n, 2n обозначает направление миграции ДНК.

1.1.3.3. Анализ коротких новосинтезированных нитей ДНК

Наиболее широкое распространение среди всех методов картирования ориджинов репликации получил анализ коротких новосинтезированных нитей ДНК (нсДНК) (NSAA: nascent strands abundance assay) (Vassilev *et al.*, 1990). Так как синтез ДНК происходит двунаправленно от ориджина репликации, то в районе ориджина в определенный промежуток времени присутствуют короткие молекулы нсДНК. Районы в геноме, в которых наблюдается обогащение короткой нсДНК, соответствуют активным ориджинам репликации (Рисунок 5). Для картирования ориджинов репликации из асинхронно делящейся культуры клеток выделяют фракцию нсДНК размером от 500 п. н. до 1500 п. н. Минимальный размер нсДНК должен быть больше размера фрагментов Оказаки. Фракционирование нсДНК осуществляют методом щелочного электрофореза в агарозном геле, либо центрифугированием в градиенте сахарозы (Staib, Grummt, 1997). Один из важных моментов в данной методике состоит в необходимости избавления от фрагментированной ДНК, которая образуется в процессе выделения. Для этого проводят включение бромдезоксимуридина (BrdU) в реплицирующуюся ДНК и затем осуществляют обогащение нсДНК методом иммунопреципитации (Vassilev *et al.*, 1990). Другой способ, более распространенный, это обработка препарата нсДНК λ -экзонуклеазой, которая гидролизует фрагменты ДНК, не защищенные на 5' конце РНК праймером (Gerbi, 2005; Gerbi, Bielinsky, 1997). Кроме того, в ряде работ был использован способ, при котором лизис клеток проводили в ячейках агарозного геля непосредственно перед фракционированием (Kamath, Leffak, 2001; Gerhardt *et al.*, 2006). Данный метод позволяет свести к минимуму манипуляции с геномной ДНК и возможность ее фрагментирования. Далее анализ нсДНК проводят методами ПЦР, микрочипов или секвенирования. Методом NSAA было проведено полногеномное картирование ориджинов репликации у *S. pombe* (Xu *et al.*, 2012), *D. melanogaster* (Cayrou *et al.*, 2011), *M. musculus* (Cayrou *et al.*, 2011; Sequera-Mendes *et al.*, 2009), *H. sapiens* (Cadoret *et al.*, 2008; Karnani *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2011; Valenzuela *et al.*, 2011). Стоит отметить, что результаты, полученные при картировании ориджинов человека с использованием данного метода в одном типе клеток в различных исследованиях, имеют низкий уровень совпадения. Этот факт

говорит о том, что данный метод позволяет идентифицировать лишь определенный набор наиболее эффективных ориджинов. Однако, при анализе нсДНК, полученных из клеток человека методом глубокого секвенирования (deep-sequencing), было обнаружено около 250,000 ориджинов, причем данный набор также включал ранее идентифицированные ориджины в аналогичных типах клеток (Besnard *et al.*, 2012; Gilbert, 2012).

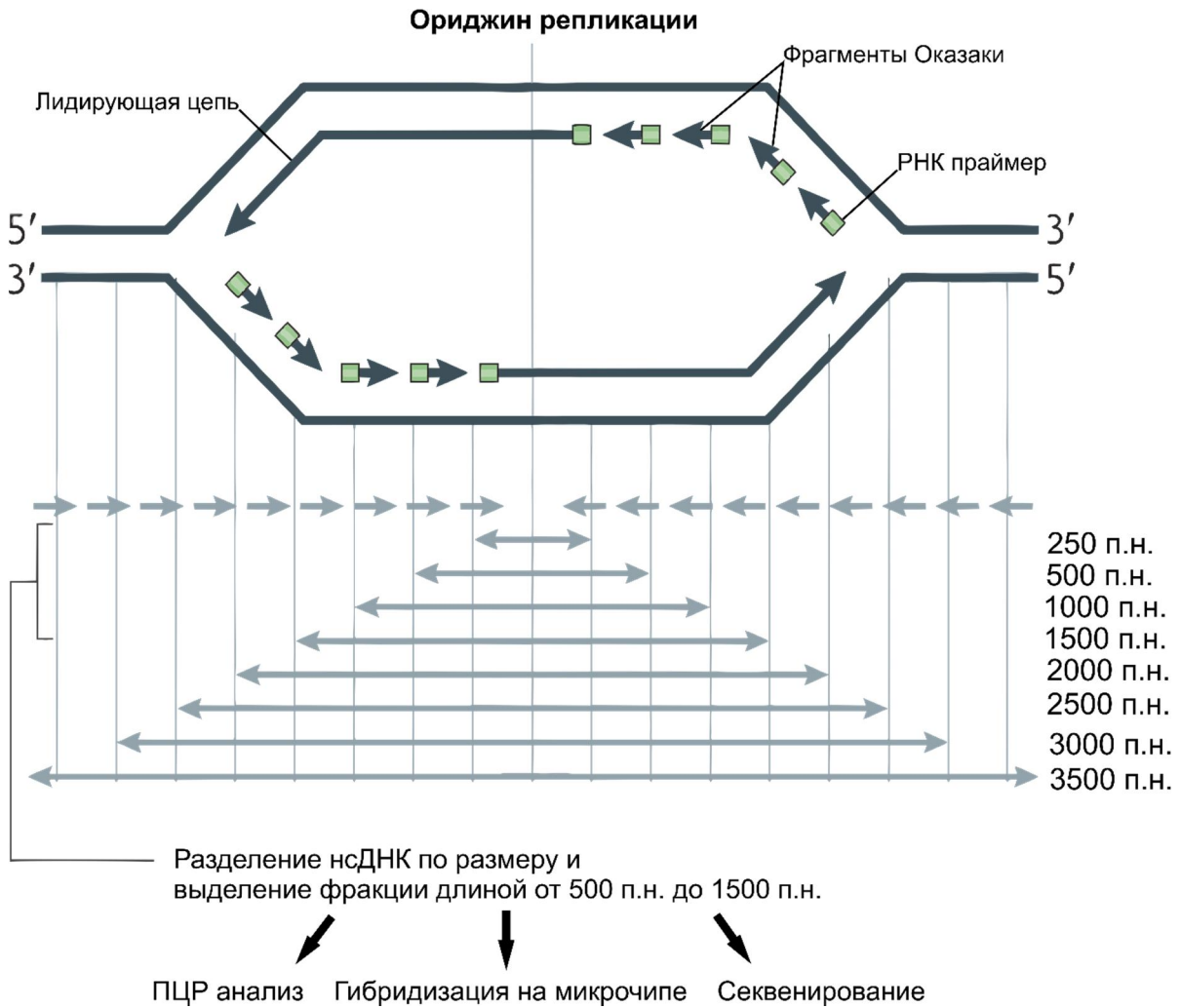


Рисунок 5. Принцип метода NSAA (Gilbert, 2010). Пояснения даны в тексте.

1.1.3.4. Bubble-trap метод

Еще один способ поиска активных ориджинов представляет собой метод, получивший название bubble-trap. Данный метод основан на захвате пузырей репликации (replication bubble) в полимеризованную агарозу (Рисунок 6) (Mesner *et al.*, 2006). Геномную ДНК обрабатывают эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*. Полученные короткие фрагменты ДНК, которые содержат пузырь репликации,

соответствуют ориджинам. Далее ДНК заключают в полимеризованную агарозу. Отделение линейных фрагментов и фрагментов ДНК, содержащих вилки репликации, проводят методом гель-электрофореза. Фрагменты, содержащие пузыри репликации, клонируют в плазмидный вектор и далее проводят анализ полученной библиотеки. В последней работе по картированию ориджинов в геноме человека с использованием данного метода было выявлено около 120,000 ориджинов репликации (Mesner *et al.*, 2013). При сравнении данных результатов с библиотекой ориджинов, полученной при секвенировании нсДНК, было показано совпадение только 50% ориджинов. Было предположено, что данный метод позволяет идентифицировать ориджины, которые имеют очень низкую эффективность и не обнаруживаются при анализе нсДНК. Один из недостатков данного метода – отсутствие возможности выявить ориджины, расположенные вблизи сайтов рестрикции.

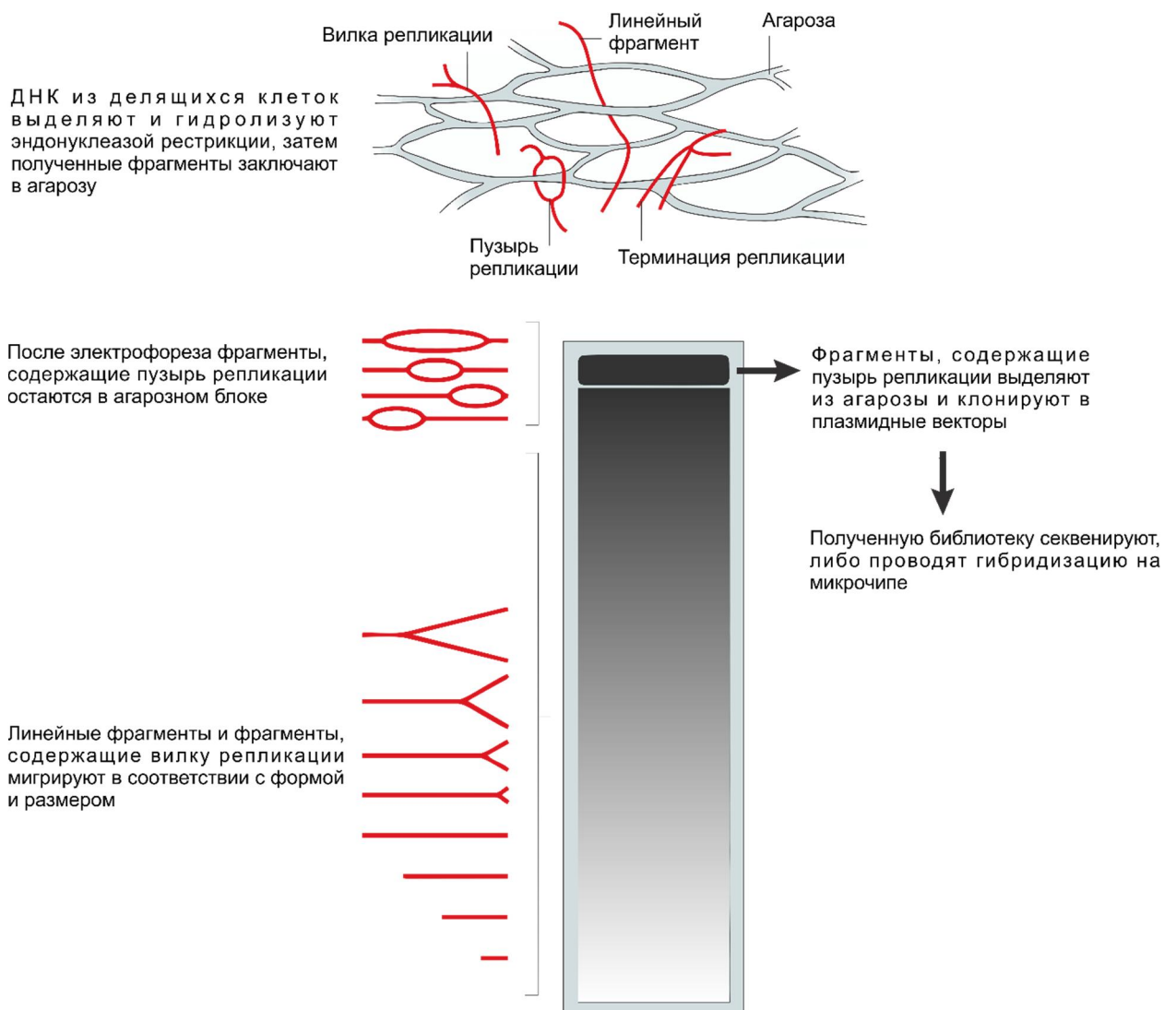


Рисунок 6. Принцип метода bubble-trap (Gilbert, 2010). Пояснения даны в тексте.

1.1.3.5. Картирование точек старта репликации на уровне отдельных нуклеотидов

Вышеописанные методы картирования ориджинов репликации имеют разрешение в несколько сотен пар нуклеотидов. Чтобы определить точки инициации репликации на уровне отдельных нуклеотидов был разработан метод, получивший название replication initiation point (RIP) mapping (Gerbi, Bielinsky, 1997). Для определения точки старта синтеза ДНК выделяют нсДНК и затем проводят реакцию удлинения праймера, меченного на 5' конце радиоактивной меткой, либо дигоксигенином. Полученные продукты анализируют методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующей детекцией. При этом размер минимального продукта будет соответствовать расстоянию от праймера до точки старта репликации. Продукты, имеющие большую длину, в основном соответствуют фрагментам ДНК, полученным при лигировании лидирующей цепи и фрагментов Оказаки. Для избавления от данных продуктов при картировании точек старта репликации у *S. cerevisiae* были использованы штаммы дрожжей, мутантные по ДНК лигазе I (Bielinsky, Gerbi, 1999). Так как для млекопитающих данный способ не применим, то используется обработка клеток эметином, который ингибирует синтез фрагментов Оказаки, при этом не влияя на синтез лидирующей цепи. При помощи данного метода были определены точки старта репликации ряда ориджинов у дрожжей *S. cerevisiae* (Bielinsky, Gerbi, 1998, 1999) и *S. pombe* (Gomez, Antequera, 1999), мухи *Sciara coprophila* (Bielinsky *et al.*, 2001) и у человека (Abdurashidova *et al.*, 2000; Romero, Lee, 2008). При анализе точек старта репликации ориджина, ассоциированного с геном *LaminB2* человека, было установлено, что репликация на данном ориджине иницируется с одного и того же места (Abdurashidova *et al.*, 2000; Romero, Lee, 2008). В отличие от данного ориджина, ориджин репликации, расположенный в районе промотора гена *DBF4* человека, имеет две зоны инициации репликации с множеством точек старта синтеза ДНК (Romero, Lee, 2008). При этом данные зоны расположены выше и ниже сайта старта транскрипции. Таким образом, данный метод представляет собой хороший инструмент для изучения процесса инициации репликации на отдельных ориджинах.

1.1.3.6. Метод молекулярного комбинга

Отдельно стоит выделить метод молекулярного комбинга, позволяющий анализировать отдельные молекулы ДНК. В основе данного метода лежит процесс прикрепления молекул ДНК к специально обработанной поверхности стекла с последующим растягиванием за счет силы поверхностного натяжения на границе раздела фаз воздух-жидкость (Bensimon *et al.*, 1994). При этом использование флуоресцентного красителя YOYO-1 позволяет добиться равномерного растяжения нитей ДНК на стекле, причем 1 мкм растянутой нити соответствует 2 т.п.н. ДНК (Chan *et al.*, 2006). Полученные препараты ДНК можно анализировать методами иммунофлуоресцентного окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ*. С помощью данного метода было получено прямое доказательство двунаправленного синтеза ДНК от ориджина репликации, а также проведена количественная оценка скорости вилок репликации и их плотности у человека *in vitro* (Marheineke *et al.*, 2005) и *in vivo* (Anglana *et al.*, 2003). Для анализа параметров репликации, таких как скорость вилки репликации и расстояние между ориджинами, проводят последовательное импульсное включение двух аналогов дезоксирибонуклеотидов, например, йоддезоксидуридина (IdU) и хлордезоксидуридина (CldU) (Bianco *et al.*, 2012; Lebofsky, Bensimon, 2003). Окрашивание препаратов растянутых нитей с использованием антител против IdU и CldU позволяет визуализировать треки репликации. Совмещение иммунофлуоресцентного окрашивания и флуоресцентной гибридизации *in situ* дает возможность выявить расположение ориджинов репликации в определенном локусе (Рисунок 7). Метод молекулярного комбинга был использован для картирования ориджинов репликации в локусах *IGH*, *POU5F1*, *NANOG* человека, в локусе *Igh* мыши (Norio *et al.*, 2005; Schultz *et al.*, 2010). Основное преимущество данного метода состоит в том, что он позволяет выявлять активность ориджинов репликации в отдельных клетках, в то время как остальные методы дают суммарную картину в популяции клеток. К сожалению, данный метод, на сегодняшний день, не адаптирован для полногеномного картирования ориджинов.

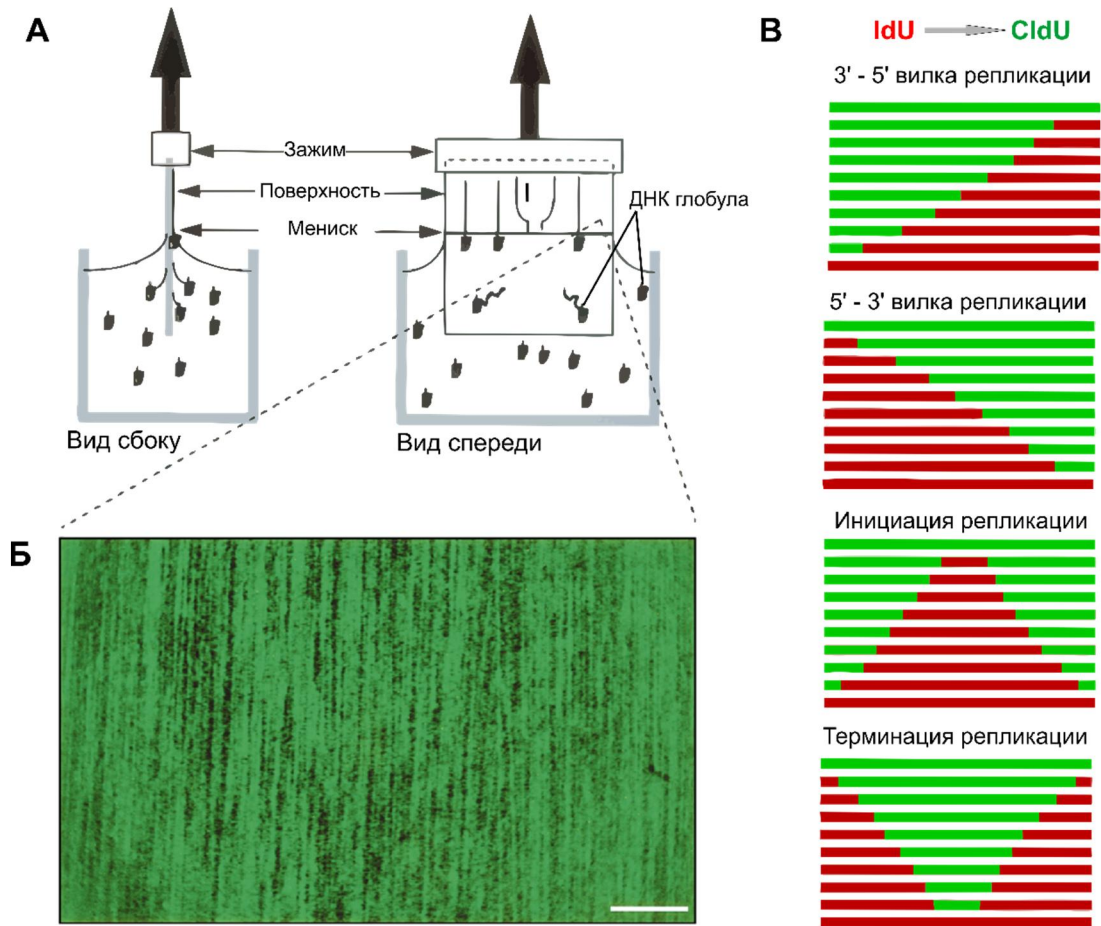


Рисунок 7. Принцип метода молекулярного комбинга (Michalet *et al.*, 1997; Schultz *et al.*, 2010). (А). Стекло, очищенное и силанизованное, опускают в раствор ДНК, где происходит присоединение 5'-концов молекул ДНК к поверхности стекла. При извлечении стекла из раствора, под действием силы поверхностного натяжения, молекулы ДНК расправляются и выравниваются на краю мениска, образуя ровные прямые нити. (Б) Поверхность стекла после процесса молекулярного комбинга. Нити ДНК окрашены флуоресцентным красителем YOYO-1. (В). Схематичное представление паттерна репликации. В реплицирующуюся ДНК включают последовательно аналоги дезоксирибонуклеотидов, осуществляют вытягивание нитей на стекле и затем проводят иммунофлуоресцентное окрашивание. В зависимости от полученной картины определяют районы инициации и терминации репликации, а также направление синтеза ДНК.

1.1.4. Эффективность ориджинов репликации

Геном эукариот содержит гораздо большее количество ориджинов, чем требуется для репликации всего генома. Лишь часть из общего пула лицензированных ориджинов активируется в S фазе. С помощью метода молекулярного комбинга было показано, что в эмбриональных фибробластах мыши активируется около двадцати процентов от всех лицензированных ориджинов (Caugou *et al.*, 2011). Избыток ориджинов в геноме эукариот, вероятно, необходим

для обеспечения репликации всего генома в условиях репликативного стресса, а также для быстрой репликации генома в раннем развитии (Doksani *et al.*, 2009; Hugi *et al.*, 1995; Ibarra *et al.*, 2008). В то время как некоторые ориджины конститутивны, то есть активируются практически в каждой S фазе во всех типах клеток, большинство ориджинов активируются с определенной вероятностью, которая различна для каждого ориджина и зависит от типа клеток. Частота, с которой активируется ориджин репликации в популяции клеток, называется его эффективностью. Эффективность ориджинов дрожжей может достигать 90% (Heichinger *et al.*, 2006). Эффективность большинства ориджинов у высших эукариот низка и составляет, по некоторым оценкам, от пяти до двадцати процентов (Hamlin *et al.*, 2008; Lebofsky *et al.*, 2006). Было предположено, что в геноме высших эукариот ориджины репликации организованы в протяженные зоны инициации репликации, состоящие из большого количества низкоэффективных ориджинов (Mesner *et al.*, 2011, 2013). Кроме того, показано наличие “спящих” ориджинов репликации, которые иницируют репликацию в условиях репликативного стресса (Ibarra *et al.*, 2008).

Считается, что эффективность ориджинов определяется окружающей структурой хроматина и регулируется эпигенетически. Большое количество белков, участвующих в процессе инициации репликации, требует определенной степени декомпактизации хроматина в районе ориджина. Таким образом, районы с наиболее открытой структурой хроматина будут иницировать репликацию чаще. Кроме того, показано наличие ответственного за активацию ориджинов лимитирующего фактора, малое количество которого позволяет активировать одновременно лишь часть ориджинов (Edwards *et al.*, 2002; Rhind, 2006; Walter, Newport, 1997). Наиболее вероятным лимитирующим фактором считается CDC45 (Wong *et al.*, 2011). Показано, что количество данного белка мало по сравнению с количеством других белков, участвующих в инициации репликации. Так как CDC45 входит в состав геликазного комплекса и участвует в продвижении вилки репликации, то количество одновременно активных ориджинов ограничено количеством данного белка. Кроме того, увеличение количества CDC45 приводит к активации большего числа ориджинов. Также в роли лимитирующего фактора могут выступать CDC7-DBF4 киназа, CDK1 и CDK2 (Patel *et al.*, 2008; Krasinska *et al.*, 2008). Таким образом,

уровень эффективности ориджина, вероятно, обуславливается его доступностью для лимитирующего фактора или факторов, необходимых для его активации.

1.1.5. Локализация ориджинов репликации в промоторах генов и их регуляция

В результате ряда работ по полногеномному картированию ориджинов репликации высших эукариот было установлено, что значительная часть ориджинов расположена в промоторах генов (Cadoret *et al.*, 2008; MacAlpine *et al.*, 2010; Eaton *et al.*, 2011; Sequera-Mendes *et al.*, 2009). Известно, что промоторы генов характеризуются пониженной плотностью нуклеосом, гиперчувствительностью к ДНКазе I и открытой структурой хроматина, что, вероятно, способствует лицензированию и активации ориджинов репликации. В действительности, ORC зачастую связывается с ДНК в районах, для которых характерна низкая нуклеосомная плотность и обогащение факторами ремоделинга хроматина. В одном из первых экспериментов на *S. cerevisiae* было показано, что наличие нуклеосом в районе связывания ORC ингибирует инициацию репликации (Simpson, 1990). Привлечение белков группы Polycomb у *D. melanogaster* также ингибирует активность ориджинов за счет упаковки в гетерохроматин (Aggarwal, Calvi, 2004). Связывание ORC в районах, свободных от нуклеосом и содержащих факторы ремоделинга хроматина, продемонстрировано на полногеномном уровне для ряда модельных организмов, таких как *S. cerevisiae* (Berbenetz *et al.*, 2010; Eaton *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2009), *D. melanogaster* (Eaton *et al.*, 2011; MacAlpine *et al.*, 2010; Petesch, Lis, 2008), *Homo sapiens* (Yin *et al.*, 2009), *Cricetulus griseus* (Lubelsky *et al.*, 2011). Кроме того, при использовании методов картирования активных ориджинов репликации в геноме человека и некоторых видов дрожжей также показан значимый уровень ассоциации с сайтами, гиперчувствительными к ДНКазе I (Cadoret *et al.*, 2008; Karnani *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2011; Mesner *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2012). Также было показано связывание ORC в районах с повышенной динамикой смены нуклеосом, характеризующихся наличием варианта гистона H3.3 в геномах *D. melanogaster* и *Arabidopsis thaliana* (Deal *et al.*, 2010; Eaton *et al.*, 2011; MacAlpine *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2010; Stroud *et al.*, 2012). Подробный анализ нуклеосомной архитектуры нескольких ориджинов мыши показал, что ORC связывается в участке

свободном от нуклеосом, в то время как инициация репликации происходит в участке, упакованном в нуклеосомы (Lombrana *et al.*, 2013). Таким образом, связывание ORC с ДНК в доступных для данного комплекса местах, иными словами в районах с низким уровнем компактизации хроматина, один из вероятных механизмов, определяющих локализацию ориджинов репликации. Тем не менее, некоторые исследователи считают, что отсутствия нуклеосом не достаточно для связывания ORC с ДНК (Lubelsky *et al.*, 2011). Стоит отметить, что связывание ORC с ДНК также влечет за собой изменения в расположении соседних нуклеосом (Berbenetz *et al.*, 2010; Hizume *et al.*, 2013; Lipford, Bell, 2001).

1.1.5.1. Участие комплексов ремоделинга хроматина в регуляции ориджинов репликации

За образование свободных от нуклеосом районов ответственны комплексы ремоделинга хроматина. В ряде работ было продемонстрировано, что для активации некоторых ориджинов репликации необходимы комплексы ремоделинга хроматина. Так комплекс SWI/SNF необходим для активации тех ориджинов у *S. cerevisiae*, у которых отсутствует сайт связывания белка ABF1 (Flanagan, Peterson, 1999). Предполагается, что SWI/SNF участвует в создании открытой структуры хроматина в районе ориджина при отсутствии ABF1. В клетках человека ориджин репликации вируса Эпштейна-Барра теряет активность при нокауте гена, кодирующего SNF2H – субъединицу ряда комплексов ремоделинга хроматина (Zhou *et al.*, 2005). Также в пользу участия комплексов ремоделинга хроматина в регуляции ориджинов репликации свидетельствует взаимодействие SNF2H с CDT1, что способствует связыванию MCM комплекса, необходимого для лицензирования ориджинов (Sugimoto *et al.*, 2008, 2011). Комплекс FACT, основная функция которого – разборка нуклеосом в ходе транскрипции, вероятно, участвует совместно с комплексом MCM в плавлении ДНК при инициации репликации (Reinberg, Sims, 2006; Tan *et al.*, 2006, 2010). Таким образом, данные факты свидетельствуют об участии комплексов ремоделинга хроматина в лицензировании и активации ориджинов репликации. Кроме того, комплексы ремоделинга хроматина необходимы при элонгации репликации, в частности они играют важную роль в деконденсации

гетерохроматина. При нокауте генов, кодирующих ACF1 и SNF2H, нарушается репликация прицентромерного гетерохроматина (Collins *et al.*, 2002). Однако, данные нарушения устраняются при деконденсации прицентромерного гетерохроматина, вызванной действием 5-аза-дезоксцитидина.

1.1.5.2 Участие факторов транскрипции в регуляции ориджинов репликации

Промоторы генов содержат сайты связывания транскрипционных факторов (ТФ). Основная функция ТФ – регуляция экспрессии генов. Тем не менее, ТФ могут также участвовать в регуляции процесса инициации репликации. Так в ряде работ было показано, что ТФ влияют на активность некоторых ориджинов репликации. Например, активность ориджинов репликации, ассоциированных с промоторами генов *C-MYC* и *LAMINB2* человека, зависит от связывания ТФ CREB, SP1, UBF, *C-MYC* (Dimitrova *et al.*, 1996, Swarnalatha *et al.*, 2012). Связывание ТФ *c-Myb* в локусе *Ace3* у *D. melanogaster* необходимо для активации расположенного в данном районе ориджина (Beall *et al.*, 2002). Влияние ТФ на инициацию ориджинов репликации показано в экспериментах по удалению сайтов связывания ТФ в районах ориджинов. Делеция района, который регулирует экспрессию кластера генов β -глобина, приводит к инактивации расположенного в данном локусе ориджина репликации (Aladjem *et al.*, 1995). При делеции сайта CNS-1, связывающего ТФ Gata3, в районе гена *Il-13* мыши близлежащий ориджин теряет активность, при этом паттерн модификаций хроматина в районе промотора не изменяется (Hayashida *et al.*, 2006). С другой стороны, привлечение ТФ может стимулировать активацию ориджина. Так в результате связывания ТФ GAL4-VP16 и TBP с плазмидной ДНК в системе *in vitro* происходит активация ориджина в данном районе (Danis *et al.*, 2004). При этом наблюдается увеличение уровня ацетилирования гистона H3.

Для того, чтобы понять каким образом ТФ осуществляют регуляцию ориджинов репликации, необходимо более подробно изучить события, происходящие при связывании ТФ и влияющие на активность ориджина. В одной из работ были исследованы события, происходящие при связывании ТФ *C-MYC* с промотором гена *LAMINB2* человека, которые приводят к активации расположенного в данном районе ориджина репликации (Swarnalatha *et al.* 2012). В

ранней G1 фазе C-MYC связывается с последовательностью E-box, расположенной в промоторе гена *LAMINB2*, что приводит к ремоделированию хроматина и триметилированию H3K4 метилтрансферазой MLL1 в данном районе. Далее связывается HBO1, которая осуществляет ацетилирование гистона H4 по пятому, восьмому, двенадцатому и шестнадцатому лизинам. Сформированная в результате открытая структура хроматина способствует связыванию комплекса MCM и лицензированию ориджина (Рисунок 8). При сайленсинге гена *C-MYC* перечисленные эпигенетические модификации не происходят, что приводит к нарушению связывания комплекса MCM с ориджином. Также было показано, что связывание ТФ C-MYC зависит от статуса метилирования промотора гена *LAMINB2*. Данный факт демонстрирует опосредованное влияние статуса метилирования ДНК на активность ориджина репликации. Таким образом, C-MYC запускает цепь событий, которые приводят к лицензированию и последующей активации ориджина. Однако, C-MYC может осуществлять регуляцию ориджинов не только в качестве ТФ. В геноме человека C-MYC участвует в регуляции структуры хроматина на определенной стадии развития за счет связывания примерно с 25,000 сайтов и привлечения гистонацетилтрансфераз (Adhikary, Eilers, 2005; Cawley *et al.*, 2004). Участие c-Myc в регуляции ориджинов репликации вне зависимости от его функции в качестве ТФ показано для мыши, человека и *X. laevis* (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). Стоит отметить, что авторы последней работы считают, что c-Myc участвует в регуляции ориджинов на стадии их активации в S фазе, а не лицензирования, как было показано в работе Swarnalatha с соавторами (Swarnalatha *et al.* 2012).

В ряде полногеномных работ был выявлен значимый уровень ассоциации ориджинов репликации с сайтами связывания ТФ в геноме человека. В одной из работ около двадцати процентов выявленных ориджинов были ассоциированы с сайтами связывания различных ТФ (Karnani *et al.*, 2010). В других работах наблюдался высокий уровень ассоциации ориджинов с сайтами связывания ТФ C-JUN, C-FOS и C-MYC человека (Cadoret *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2011; Swarnalatha *et al.*, 2012).

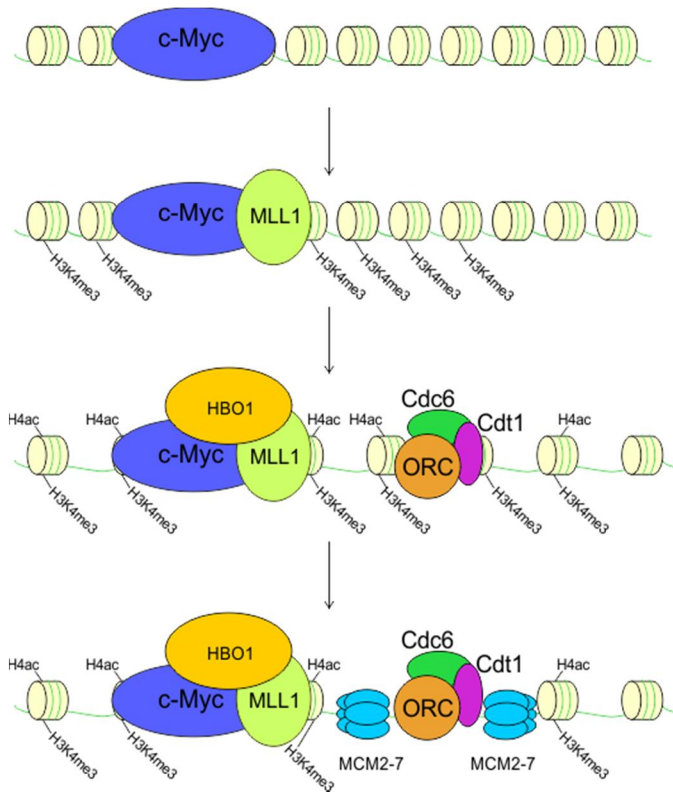


Рисунок 8. Последовательность событий при лицензировании ориджина репликации, ассоциированного с геном *LAMINB2* человека. Пояснения даны в тексте.

Таким образом, открытая структура хроматина в регуляторных районах генома, в частности в промоторах генов, образованная за счет связывания ТФ и активности комплексов ремоделинга хроматина значительно увеличивает эффективность ориджинов репликации. Однако полногеномные исследования свидетельствуют, что лишь часть ориджинов располагается в регуляторных районах генома. Таким образом, данный тип регуляции ориджинов лишь один из ряда механизмов, ответственных за создание определенной структуры хроматина, которая необходима для связывания ORC, сборки pre-RC и активации ориджина.

Также стоит отметить, что только шесть процентов ориджинов репликации, картированных методом bubble-trap, ассоциированы с промоторами и сайтами старта транскрипции, в то время, как основная часть ориджинов расположена в межгенных районах (Mesner *et al.*, 2013).

1.1.6. Механизмы регуляции ориджинов репликации, расположенных в районах гетерохроматина

Несмотря на то, что значительная часть известных ориджинов локализуется в районах с открытой структурой хроматина, гетерохроматиновые районы генома

также содержат ориджины репликации. Однако, по некоторым оценкам, их плотность в данных районах значительно ниже по сравнению с эухроматиновыми районами (MacAlpine *et al.*, 2010). Кроме того, предполагается, что ориджины в гетерохроматиновых районах располагаются поодиночке, а не образуют кластеры как в эухроматине (Mesner *et al.*, 2013). Данный факт можно объяснить тем, что ориджины, расположенные в гетерохроматине, имеют гораздо меньшую эффективность по сравнению с эухроматиновыми, что затрудняет их картирование при полногеномном анализе. Поэтому необходимы исследования по поиску низкоэффективных ориджинов в геноме для изучения механизмов их регуляции. На сегодняшний день известно, что в сборке pre-RC в районах гетерохроматина могут принимать участие гетерохроматиновые белки. Показано, что ORC взаимодействует с гетерохроматиновым белком HP1 и участвует в формировании гетерохроматина у дрозофилы и человека (Pak *et al.*, 1997; Prasanth *et al.*, 2010). В свою очередь, HP1 также может участвовать в регуляции ориджинов. У *S. pombe* белок SWI6, гомолог HP1, участвует в активации ориджинов за счет привлечения комплекса DDK/CDC7 (Hayashi *et al.*, 2009). Предполагается, что HP1 может действовать по аналогичному механизму в районах диспергированных повторов у *D. melanogaster* (Schwaiger *et al.*, 2010). Другой гетерохроматиновый белок – HMGA1, который связывается с AT-богатыми участками ДНК, способствует связыванию ORC с ДНК (Thomae *et al.*, 2008). Таким образом, можно предположить, что в регуляции ориджинов репликации в районах гетерохроматина участвуют другие факторы и механизмы, специфичные для данного типа хроматина.

1.1.7. Модификации гистонов в районах ориджинов репликации

В регуляции структуры хроматина принимают участие модификации N-концевых остатков гистонов. В ряде полногеномных исследований ориджинов репликации мыши, человека и дрозофилы был показан высокий уровень корреляции ориджинов с модификациями активного хроматина, такими как ацетилированный гистон H3 по девятому, четырнадцатому, восемнадцатому и двадцать седьмому лизинам (H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K27ac), ацетилированный гистон H4 (H4ac), ди- и триметилированный гистон H3 по четвертому лизину (H3K4me2,3) и

моно- и триметилированный гистон H3 по тридцать шестому лизину (H3K36me1,3) (Cadoret *et al.*, 2008; Eaton *et al.*, 2011; Karnani *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2011; Mesner *et al.*, 2013; Sequeira-Mendes *et al.*, 2009; Valenzuela *et al.*, 2011). Данные модификации, за исключением H3K36me1,3, характерны для промоторов генов. В геноме *D. melanogaster* ориджины, удаленные от сайтов старта транскрипции, обогащены H3K18ac и H3K36me1 (Eaton *et al.*, 2011). В геноме человека ориджины также обогащены модификацией H3K36me3, которая также характерна для тела гена (Mesner *et al.*, 2013). Таким образом, данный набор модификаций гистонов не универсален для всех ориджинов, а лишь отражает их расположение в геноме.

1.1.7.1. Ацетилирование гистонов стимулирует активность ориджинов

Ацетилирование гистонов – одна из основных модификаций, характерных для открытого хроматина, которая стимулирует активность ориджинов. Известно, что в лицензировании ориджинов репликации человека принимает участие гистонацетилтрансфераза HBO1 (Iizuka *et al.*, 2009; Miotto Struhl, 2008). HBO1 присутствует в клетке в концентрации, эквивалентной числу активных ориджинов репликации, что указывает на значительную роль данного фермента в процессе инициации репликации. Кроме того, было показано, что HBO1 взаимодействует с ORC1 и CDT1 и ацетилюет гистон H4 по пятому и двенадцатому лизинам в G1 фазе. Ацетилирование и последующая деконденсация хроматина способствует посадке комплекса MCM2-7, ключевого участника в процессе лицензирования ориджина (Burke *et al.*, 2001; Iizuka, Stillman, 1999; Iizuka *et al.*, 2006; Miotto, Struhl, 2008, 2010; Wong *et al.*, 2010). Существуют различные гистонацетилтрансферазные комплексы, в состав которых входит HBO1. Кроме HBO1 в состав такого комплекса могут входить белки ING4/5, которые связывают триметилированный H3K4 (Saksouk *et al.*, 2009). Таким образом, H3K4me3 может способствовать привлечению HBO1 на ориджины, содержащие данную модификацию. У *D. melanogaster* привлечение гомолога HBO1 – гистонацетилтрансферазы Chameau и последующее ацетилирование гистонов стимулирует активность ориджина (Aggarwal, Calvi, 2004). Стоит отметить, что формирование pre-RC индуцирует ацетилирование гистона H4 по двенадцатому лизину, что позволяет предположить, что

ацетилирование в районах активных ориджинов может быть следствием активности Chameau или других гистонацетилтрансфераз (Crevel, Cotterill, 2012; McConnel *et al.*, 2012).

Таким образом, ацетилирование гистонов гистонацетилтрансферазой HBO1 может стимулировать активность ориджина за счет деконденсации хроматина, однако, данная модификация не характеризует все ориджины. Существует множество примеров активных ориджинов, расположенных в гипoaцетилированных районах (Crampton *et al.*, 2008; Hayashida *et al.*, 2006; Prioleau *et al.*, 2003). В дополнение, существует предположение, что HBO1 может регулировать лицензирование ориджинов за счет ацетилирования белков, участвующих в формировании pre-RC (Iizuka *et al.*, 2006).

1.1.7.2. Метилирование H4K20 участвует в регуляции лицензирования ориджинов репликации

В ряде работ было установлено, что метилирование гистона H4 по двадцатому лизину (H4K20me) играет важную роль в лицензировании ориджинов репликации. В целом, различные степени метилирования H4K20 у млекопитающих участвуют в регуляции различных процессов, среди которых митоз, ответ на повреждения ДНК, транскрипция, формирование гетерохроматина и репликация. На сегодняшний день известен только один фермент, осуществляющий монометилирование H4K20, – гистонметилтрансфераза PR-SET7 (Nishioka *et al.*, 2002). Количество PR-SET7 и уровень H4K20me1 зависят от стадии клеточного цикла (Oda *et al.*, 2009; Pesavento *et al.*, 2008). Максимальное количество PR-SET7 наблюдается в G2 фазе, затем оно уменьшается и достигает минимума в S фазе следующего клеточного цикла. В то же время, уровень H4K20me1 увеличивается, начиная с конца S фазы, достигает максимума в M фазе и падает в ходе репликации ДНК. Экспериментальные данные демонстрируют важную роль PR-SET7 в поддержании стабильности генома. При мутации обоих аллелей гена, кодирующего PR-SET7, наблюдается смерть эмбрионов мыши до восьмиклеточной стадии (Oda *et al.*, 2009). При мутации данного гена в клетках человека нарушается связывание ORC с ДНК и, соответственно, лицензирование ориджинов репликации (Tardat *et al.*, 2007, 2010). С

другой стороны, привлечение PR-SET7 в локус, который не содержит ориджин репликации, индуцирует сборку pre-RC. Накопление недеградируемой мутантной формы PR-SET7 в S фазе приводит к ререпликации ДНК. Механизм, по которому данная модификация участвует в лицензировании ориджинов, еще неокончательно изучен. Существуют свидетельства, что действие H4K20me1 может быть опосредованным. Известно, что гистонметилтрансферазы SUV4-20H1 и SUV4-20H2, которые осуществляют ди- и триметилирование H4K20, используют H4K20me1 в качестве субстрата (Beck *et al.*, 2012; Schotta *et al.*, 2008). Показано, что белок ORCA, который, как предполагается, участвует в связывании ORC с ДНК, взаимодействует с H4K20me3 (Shen *et al.*, 2010; Vermeulen *et al.*, 2010). Интересно, что привлечение PR-SET7 приводит к повышению H4K20me3 в данном локусе (Beck *et al.*, 2012). С другой стороны, при уменьшении уровня H4K20me3 показано отсутствие связывания белков ORCA и ORC1. Также было показано, что ORC1 связывается с H4K20me2 через ВАН домен. Важную роль ди- и триметилирования H4K20 в регуляции ориджинов репликации подтверждает тот факт, что при отсутствии данных модификаций у эмбрионов *Danio rerio* наблюдается фенотип, аналогичный наблюдаемому у человека при мутации в ВАН домене ORC1 или при нарушении экспрессии ORC1, также известный как синдром Мейера-Горлина (Kuo *et al.*, 2012).

Некоторые исследователи считают, что метилирование H4K20 может влиять на уровень ацетилирования гистона H4, уменьшая его и, тем самым, нарушая сборку pre-RC (Iizuka *et al.*, 2006; Miotto, Struhl, 2010; Nishioka *et al.*, 2002). С другой стороны, показано, что ацетилирование по шестнадцатому лизину гистона H4 преимущественно осуществляется на H4K20 диметилированных гистонах (Pesavento *et al.*, 2008).

Таким образом, PR-SET7 может регулировать связывание ORC с ДНК через метилирование H4K20. Однако механизмы данной регуляции, как и влияние различных степеней метилирования H4K20 на процесс инициации репликации, требуют дальнейшего изучения.

1.1.8. Влияние CpG островков и уровня их метилирования на активность ориджинов репликации

Как уже было сказано выше, значительная часть ориджинов репликации располагается в промоторах генов и ассоциирована с CGI. Известно, что в геноме человека около семидесяти процентов промоторов содержат CGI (Saxonov *et al.*, 2006). В геноме мыши ориджины репликации, расположенные в CGI-содержащих промоторах, характеризуются высоким уровнем эффективности (Sequeira-Mendes *et al.*, 2009). Вероятно, CGI, расположенные в промоторах генов, могут способствовать активации ориджинов репликации за счет привлечения ТФ, например, SP1, NRF-1, E2F, ETS (Butler, Kadonaga, 2002; Landolin *et al.*, 2010). Кроме того, промоторы, содержащие CGI, часто характеризуются наличием триметилированного H3K4, вне зависимости от их активности (Guenther *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2007). Таким образом, CGI через привлечение транскрипционных факторов и ферментов, осуществляющих триметилирование H3K4, могут способствовать активации ориджинов репликации. Однако, ассоциация CGI и ориджинов репликации не ограничивается генными промоторами. Так активный ориджин репликации ассоциирован с CGI, расположенном в 3' области гена лизоцима курицы (Phi-van, Stratling, 1999). Таким образом, можно предположить, что CGI участвуют в регуляции ориджинов вне зависимости от их расположения в геноме.

У позвоночных метилирование CpG-динуклеотидов в составе CGI представляет собой важный эпигенетический механизм регуляции экспрессии генов и структуры хроматина. Однако, влияние статуса метилирования CGI на активность ориджинов репликации остается спорным вопросом. В одной из первых работ по изучению влияния метилирования CGI на активность ориджинов репликации было показано, что ориджин, расположенный в локусе *DHFR* китайского хомячка, активен в культуре клеток яичников (CHO: chinese hamster ovary cells) с нормальным уровнем метилирования и неактивен в клетках с пониженным уровнем метилирования CGI (Rein *et al.*, 1999). Таким образом, можно предположить, что метилирование CGI способствует активации данного ориджина. С другой стороны, активные ориджины, расположенные в промоторах генов *c-Myc* и *LaminB2*, ассоциированы с неметилированными и частично метилированными CGI,

соответственно (Araujo *et al.*, 1998; Rein *et al.*, 1999). Статус метилирования промоторов ряда генов на активной и неактивной X-хромосомах мыши и человека не влияет на активность ассоциированных с ними ориджинов (Cohen *et al.*, 2003; Gomez, Brockdorff, 2004). Ориджин репликации, расположенный в локусе генов, кодирующих фолатный рецептор и β -глобин курицы, активен вне зависимости от статуса метилирования CGI, расположенного вблизи ориджина (Prioleau *et al.*, 2003). Тем не менее, на полногеномном уровне в клетках человека показано, что эффективность ориджинов, ассоциированных с метилированными CGI, выше по сравнению с ориджинами, ассоциированными с неметилированными CGI (Martin *et al.*, 2011). Авторы данной работы предполагают, что статус метилирования CGI влияет на эффективность ориджинов репликации за счет регуляции транскрипции в данном районе.

1.1.9. Пространственная организация репликации в ядре. Фокусы репликации

При включении аналогов дезоксирибонуклеотидов в реплицирующуюся ДНК и последующей окраске можно наблюдать, что репликация ДНК происходит в дискретных участках ядра. Данные участки имеют название фокусы репликации (Berezney *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 1986). Известно, что фокусы могут включать до ста репликонов, на которых происходит одновременная репликация ДНК. При этом размер одного фокуса составляет примерно 1 м.п.н. Предполагается, что белки, участвующие в репликации, собираются в репликационные фабрики, на которых и осуществляется репликация ДНК в пределах одного фокуса. Сборка репликационных фабрик осуществляется на ядерном матриксе. Количество фокусов репликации в ходе S фазы возрастает до определенного предела, что подразумевает активацию все большего числа ориджинов репликации, а затем уменьшается. В поздней S фазе фокусы репликации располагаются на периферии ядра и в районе ядрышек, что соответствует репликации гетерохроматина. Активация соседних фокусов репликации происходит последовательно, что также подтверждает наличие лимитирующего фактора, участвующего в репликации. При завершении репликации в пределах одного фокуса лимитирующий фактор освобождается и инициирует репликацию на ориджинах, расположенных в соседнем фокусе репликации (Sporbert

et al., 2002; Sadoni *et al.*, 2004). Таким образом, фокусы репликации представляют собой еще один уровень регуляции процесса инициации репликации ДНК.

1.1.10 Ассоциация ориджинов репликации с ядерным матриксом

Ядерный матрикс (ЯМ) образован негистоновыми белками и выступает в качестве структурного компонента клеточного ядра (Berezney *et al.*, 1995). При обработке ядра высокой концентрацией соли происходит экстракция белков хроматина, а ДНК образует петли, прикрепленные к ЯМ в особых участках – scaffold/matrix attachment regions (SAR/MAR). Считается, что ЯМ играет важную роль в формировании архитектуры ядра, а также участвует в регуляции процессов транскрипции и репликации (Ma *et al.*, 1999). В экспериментах по включению радиоактивно меченного тимидина при репликации ДНК было показано, что размер петель хроматина коррелирует с размерами репликонов, а синтез ДНК осуществляется от основания петель к периферии (Buongiorno-Nardelli *et al.*, 1982; Pardoll *et al.*, 1980).

Предполагается, что ориджины репликации ассоциированы с ЯМ на определенной стадии клеточного цикла (Рисунок 9). Было показано, что участок ДНК, содержащий ориджин репликации OriGNAI3 китайского хомячка, ассоциирован с ЯМ в G1 фазе, однако, после репликации ассоциация данного ориджина с ЯМ теряется и восстанавливается в M фазе (Courbet *et al.*, 2008). Также в данной работе продемонстрировано, что при уменьшении скорости движения вилки репликации происходит активация ранее неактивных, потенциальных ориджинов. В G1 фазе следующего клеточного цикла наблюдается ассоциация данных ориджинов с ЯМ и уменьшение длины петель хроматина. Ранее было установлено, что реорганизация петель хроматина в M фазе связана с активностью топоизомеразы II – одного из компонентов ЯМ (Larsen *et al.*, 1996). В эмбрионах *X. laevis* уменьшение длины петель хроматина за счет активности топоизомеразы II приводит к уменьшению расстояния между активными ориджинами (Lemaitre *et al.*, 2005). В результате экспозиции ядер из культуры клеток китайского хомячка в экстракте яиц *X. laevis* наблюдается активация ранее неактивного ориджина в локусе *DHFR* (Lawlis *et al.*, 1996). Причем, для активации данного ориджина требуется

прохождение ядер через М фазу в экстракте и реорганизация петель хроматина топоизомеразой II.

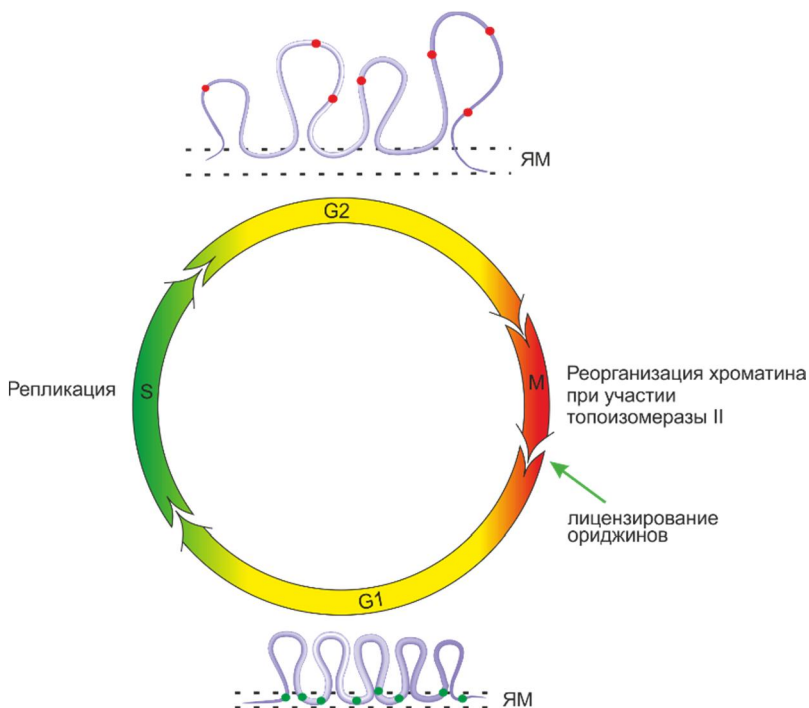


Рисунок 9. Расположение ориджинов репликации относительно ЯМ в клеточном цикле.

Лицензированные ориджины репликации ассоциированы с ЯМ в G1 фазе. После репликации ДНК ориджины теряют ассоциацию с ЯМ, которая восстанавливается после прохождения митоза и лицензирования ориджинов.

Зеленым отмечены лицензированные ориджины, красным – не лицензированные ориджины в G2 фазе.

Известно, что в формировании петель хроматина участвует множество белков и белковых комплексов. Один из них – это когезиновый комплекс, основной функция которого – сцепление сестринских хроматид. Кроме того, когезины участвуют во множестве других процессов, среди которых присутствует репликация ДНК (Mehta *et al.*, 2013). Так совместная локализация ORC и когезинового комплекса была показана у *D. melanogaster* (MacAlpine *et al.*, 2010). Выявлено, что когезины взаимодействуют с компонентами pre-RC и ассоциированы с ориджинами человека (Guillou *et al.*, 2010). При этом нарушение связывания когезинового комплекса с ДНК приводит к замедлению S фазы, уменьшению количества активных ориджинов и увеличению длины петель хроматина. Таким образом, организация петель хроматина при участии когезинового комплекса может влиять на активность ориджинов репликации. В свою очередь, ORC участвует в связывании когезинового комплекса с ДНК. Было установлено, что у *X. laevis* при нарушении лицензирования ориджинов также нарушается связывание когезинов с ДНК (Takahashi *et al.*, 2004). Однако, у *D. melanogaster* связывание когезинов с ДНК не зависит от формирования pre-RC (MacAlpine *et al.*, 2010).

У дрожжей *S. cerevisiae* петлевая организация хроматина также может участвовать в регуляции ориджинов репликации. Forkhead белки взаимодействуют с ORC и участвуют в формировании петель хроматина, что способствует привлечению CDC45 на ориджины, расположенные в основании петель, и их активации в ранней S фазе (Knott *et al.*, 2012).

Ассоциация с ЯМ была продемонстрирована для активных ориджинов репликации, расположенных в локусе генов β -глобина курицы, в районе гена *c-Мус* мыши и *X. laevis*, в районе генов *DYSTROPHIN* и *LAMINB2* человека, в локусе *DHFR* китайского хомячка (Dijkwel, Hamlin, 1988; Girard-Reydet *et al.*, 2004; Iarovaia *et al.*, 2004; Lagarkova *et al.*, 1998; Razin *et al.*, 1986). В ряде работ последовательности SAR/MAR использовались для создания векторов, способных реплицироваться и поддерживаться в культуре клеток млекопитающих, что подтверждает гипотезу об ассоциации ориджинов с ЯМ. Наличие района, содержащего ориджин репликации и последовательность SAR/MAR, обеспечивает поддержание YAC вектора в культуре клеток HeLa (Cossons *et al.*, 1997). Для плазмидного вектора, содержащего последовательность SAR/MAR, показано прикрепление к ЯМ и его репликация в культуре эритробластов курицы (Vassetzky *et al.*, 2000б). Наличие тетрамерной последовательности SAR/MAR в эписомном векторе обеспечивает его репликацию и поддержание в CHO клетках (Jenke *et al.*, 2004). Таким образом, можно предположить, что наличие последовательности SAR/MAR способствует прикреплению вектора к ЯМ, сборке машины репликации в данном районе и инициации репликации.

Тем не менее, ассоциация ориджинов репликации с районами прикрепления к ЯМ остается спорной гипотезой. Единственное на данный момент полногеномное картирование SAR/MAR показало низкий уровень корреляции с расположением ориджинов репликации в геноме человека (Keaton *et al.*, 2011). Значительная часть SAR/MAR ассоциирована с активно транскрибируемыми генами и расположена вблизи сайтов старта транскрипции. Лишь 23 из 453 обнаруженных SAR/MAR ассоциированы с ориджинами, которые были ранее картированы в работе Cadoret с соавторами (Cadoret *et al.*, 2008). Однако, отсутствие ассоциации ориджинов репликации и SAR/MAR на уровне генома может быть обусловлено либо использованием другой популяции клеток HeLa, что предполагает другой набор

активных ориджинов, либо использованием асинхронно делящейся культуры. Таким образом, несмотря на ряд примеров, демонстрирующих ассоциацию ориджинов репликации с ЯМ, для подтверждения данной гипотезы требуются дополнительные исследования.

1.1.11. Регуляция ориджинов репликации в процессе эмбрионального развития и дифференцировки клеток

В ходе эмбрионального развития и дифференцировки клеток происходят значительные изменения в организации генома, транскрипционной активности генов и пролиферативной активности клеток. Данные события влияют на эффективность ориджинов репликации, что приводит к изменениям в паттерне инициации репликации. Так в раннем эмбриогенезе *X. laevis* и *D. melanogaster*, до активации транскрипции у эмбриона, инициация репликации происходит в случайных участках с коротким интервалом 9-12 т.п.н. (Hyrien *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 1999; Vassetzky *et al.*, 2000a). При этом ориджины активируются случайно, и отсутствует деление на ранние и поздние. Данный механизм обеспечивает быструю репликацию всего генома, что способствует уменьшению продолжительности S фазы и ускоренному клеточному делению. После стадии средней бластулы, когда происходит активация транскрипции у эмбриона, ориджины репликации локализуются в определенных сайтах в межгенных районах. Стоит отметить, что у эмбрионов *X. laevis* расположение ориджинов совпадает с районами прикрепления к ЯМ, а реорганизация петель хроматина в ходе митоза может влиять на набор активных ориджинов (Lemaitre *et al.*, 2005). Изменения в активности ориджинов в ходе развития также наблюдаются в различных участках генома и у других видов, например: в ходе эмбриогенеза у мухи *S. coprophila* в локусе П/9А, при эритроидной дифференцировке в локусе генов β -глобина курицы, в локусе *HoxB* при дифференцировке клеток эмбриональной карциномы мыши, в локусе *Igh* мыши в ходе В-клеточной дифференцировки (Lunyak *et al.*, 2002; Dazy *et al.*, 2006; Gregoire *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2009; Norio *et al.*, 2005).

На активность ориджинов репликации могут влиять изменения в транскрипционной активности генов, происходящие в ходе дифференцировки

клеток. Расположение ориджинов в районах промоторов генов предполагает наличие интерференции между процессами транскрипции и репликации. В частности, наличие транскрипционного комплекса может мешать сборке pre-RC, несмотря на открытую структуру хроматина. В клетках человека активные ориджины преимущественно ассоциированы с генами с умеренным уровнем экспрессии (Martin *et al.*, 2011). В другой работе показано, что активные ориджины расположены преимущественно в районах не экспрессирующихся генов (Mesner *et al.*, 2013). В качестве примера ингибирующего влияния транскрипционного комплекса на инициацию репликации можно привести ориджин, расположенный в проксимальной области промотора гена *CDH1* (Sideridou *et al.*, 2011). В клетках, экспрессирующих *CDH1* данный ориджин неактивен, а репрессия гена *CDH1*, за счет сайленсинга фактора CTCF, приводит к активации данного ориджина репликации (Рисунок 10). Тем не менее, активность некоторых ориджинов не зависит от транскрипционного статуса ассоциированных с ними генов. Так ориджин репликации, расположенный в 3' области гена *HoxB1* мыши, инициирует репликацию вне зависимости от транскрипционного статуса данного гена (Gregoire *et al.*, 2006). Экспрессия гена *Xist*, расположенного в центре инактивации X-хромосомы (XIC: X inactivation center) мыши, не влияет на паттерн активных ориджинов в локусе (Rowntree, Lee, 2006). С другой стороны, активация транскрипции генов локуса *Igh* мыши в ходе В-клеточной дифференцировки сопровождается активацией ориджинов репликации (Norio *et al.*, 2005). Однако, активации транскрипции и увеличения уровня модификаций активного хроматина H3ac и H3K4me3 в данном локусе в ЭС клетках недостаточно для активации ориджинов репликации (Guan *et al.*, 2009).

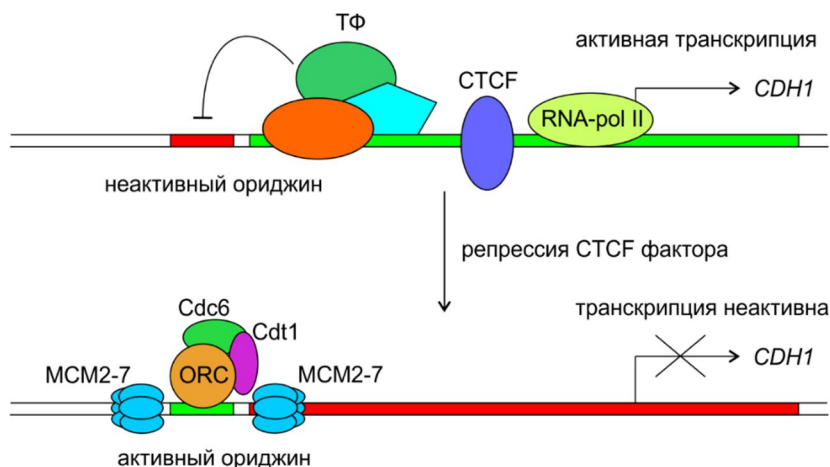


Рисунок 10. Активная транскрипция препятствует активации ориджина в промоторе гена *CDH1* человека.

Стоит отметить, что ряд белков, участвующих в регуляции дифференцировки, также вовлечены в формирование pre-RC и регуляцию ориджинов репликации. У *D. melanogaster* белок LATHEO входит в состав ORC и участвует в регуляции дифференцировки в нейральном направлении (Pinto *et al.*, 1999). Также в нейральной дифференцировке, посредством регуляции ремоделинга хроматина и экспрессии *Hox* генов, участвует Геминин – ингибитор лицензирования ориджинов репликации (Del Bene *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2005). У *Arabidopsis thaliana* Геминин участвует в дифференцировке клеток корня в эпидермальном направлении (Caro *et al.*, 2007). Гомеодомен-содержащие белки HOXC13 и HOXD13 взаимодействуют с CDC6 и участвуют в процессе инициации репликации на ранних ориджинах репликации (Comelli *et al.*, 2009; Marchetti *et al.*, 2010; Salsi *et al.*, 2009). У *D. melanogaster* нокадаун гистонацетилтрансфераз Chameau и CBP, ответственных за регуляцию ориджинов, приводит к нарушению перехода фолликулярных клеток из стадии эндоцикла на стадию амплификации (McConnel *et al.*, 2012).

Изменения в активности ориджинов могут также сопровождаться изменениями в паттерне модификаций гистонов, в частности ацетилирования гистонов H3 и H4. В локусе *HoxB* мыши репрессия ориджина сопровождается увеличением уровня ацетилирования гистона H3 (Gregoire *et al.* 2006). Однако, в ряде случаев изменения в структуре хроматина не оказывают влияния на активность ориджинов репликации. Так изменения в структуре хроматина при сайленсинге генов *POU5F1* и *NANOG*, регулирующих раннее развитие у млекопитающих, при дифференцировке ЭС клеток влияют на активность ориджина в локусе *POU5F1* (Рисунок 11) и не влияют на ориджин, расположенный в локусе *NANOG* (Perry *et al.*, 2004; Schultz *et al.*, 2010). В ходе эритроидной дифференцировки увеличение уровня ацетилирования H3K9 и H3K14 ассоциировано с активацией только одного из нескольких ориджинов репликации, расположенных в локусе генов β -глобина курицы (Dazy *et al.*, 2006).

Активность ряда ориджинов репликации не зависит от типа клеток. Для девятнадцати ориджинов в геноме мыши показано, что они активны как в ЭС клетках, так и в фибробластах (Sequeira-Mendes *et al.*, 2009). Набор активных ориджинов в центре инактивации X-хромосомы мыши не изменяется при дифференцировке ЭС клеток (Rowntree, Lee, 2006). Анализ ориджинов репликации

при полногеномном картировании в трех типах клеток человека: ЭС клетки линии Н9, эмбриональные фибробласты линии IMR-90 и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные из клеток линии IMR-90, показал, что значительная часть ориджинов репликации активируется во всех трех типах клеток (Besnard *et al.*, 2012). При этом показано, что от типа клеток зависит эффективность ориджинов. Однако, изменения при дифференцировке клеток могут влиять не только на эффективность ориджинов, но и на лицензирование. Так при полногеномном анализе сайтов связывания ORC в геноме *D. melanogaster* показано, что 28% сайтов связывания ORC уникальны для слюнных желез и не представлены в других типах клеток (Sher *et al.*, 2012). Данный факт предполагает, что изменения в ходе развития и дифференцировки клеток могут затрагивать значительную часть ориджинов в геноме *D. melanogaster*. Тем не менее, стоит отметить, что различия в паттерне связывания ORC могут быть обусловлены участием данного комплекса в других процессах, например в формировании гетерохроматина.

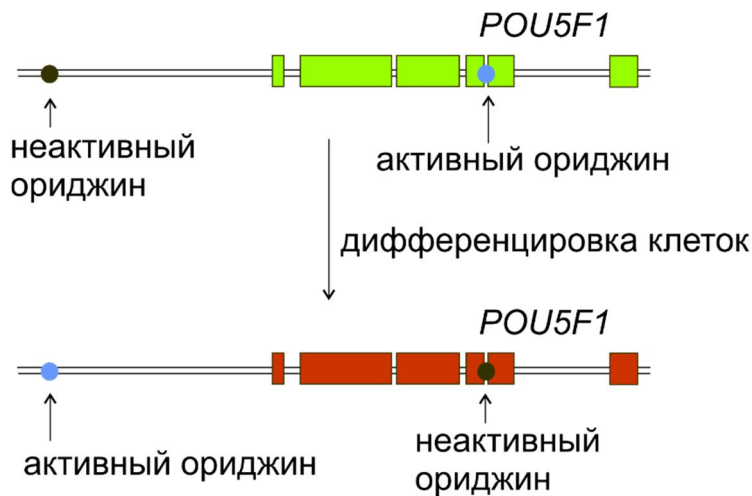


Рисунок 11. Изменения в активности ориджинов в локусе *POU5F1* человека при дифференцировке ЭС клеток.

В ЭС клетках активный ориджин репликации ассоциирован с геном *POU5F1*. После дифференцировки клеток эффективность данного ориджина значительно снижается, а эффективность ориджина, расположенного на расстоянии около 65 т.п.н. от гена *POU5F1*, значительно увеличивается. Зеленый цвет обозначает активную транскрипцию в данном локусе, красный – репрессию транскрипции в локусе.

1.1.12. Регуляция временной картины репликации генома. Репликационные домены

Активация ориджинов репликации происходит в течение всей S фазы клеточного цикла. Одна из характеристик ориджинов – время их активации в S фазе, и в зависимости от него ориджины можно разделить на ранние и поздние. Для поздних ориджинов характерно то, что на их активацию влияет система контроля повреждений ДНК в S фазе (intra-S-phase checkpoint) (Shirahige *et al.*, 1998). Активация точки контроля (checkpoint) в S фазе и ингибирование поздних ориджинов также происходят при обработке клеток гидроксимочевинной (Dimitrova, Gilbert, 2000; MacAlpine *et al.*, 2004; Shirahige *et al.*, 1998). Гидроксимочевина ингибирует синтез нуклеозидтрифосфатов, что приводит к замедлению синтеза ДНК и остановке вилок репликации (Hendricks, Mathews, 1998). Кроме того, регуляция инициации репликации на ранних и поздних ориджинах осуществляется различными циклин-зависимыми киназами. В активации ранних ориджинов участвует CDK2, а поздних – CDK1 (Katsuno *et al.*, 2009). Показано, что ориджины, клонированные в автономно реплицирующиеся плазмиды, иницируют репликацию в ранней S фазе, независимо от времени их репликации в геноме (Diffley, Labib, 2002). Таким образом, предполагается, что время активации ориджина определяется его окружением, в частности структурой окружающего хроматина.

В последние несколько лет в результате полногеномных исследований временной программы репликации было установлено, что геном состоит из протяженных доменов поздней и ранней репликации. Репликационные домены (РД) имеют размер от 200 до 2,000 т.п.н. и, как считается, включают в себя несколько фокусов репликации (Hiratani *et al.*, 2008; Hiratani *et al.*, 2010; Pope *et al.*, 2010; White *et al.*, 2004). Также существует мнение, что фокусы репликации – это цитологический аналог РД (Rhind, Gilbert, 2013). Установлено, что программирование времени репликации осуществляется в каждом клеточном цикле в G1 фазе, и время репликации доменов зависит от их расположения в ядре во время программирования (Gilbert, 2001; Gilbert, 2010; Gilbert *et al.*, 2010). Так для поздних ориджинов репликации характерно расположение на периферии ядра. В ходе репликации происходит “стирание” временной программы репликации и хроматин

в G2 фазе не содержит определяющих время репликации детерминант (Dimitrova, Gilbert, 1999; Lu *et al.*, 2010). Полногеномный анализ пространственных взаимодействий в ядре показал, что весь хроматин можно разделить на два компартмента, которые отличаются по времени репликации (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009; Ryba *et al.*, 2010). Что характерно, данные компартменты различаются по доступности для белков, участвующих в инициации репликации.

Для ранних РД характерно наличие активной транскрипции и модификаций гистонов, свойственных открытому хроматину, в то время как поздние РД характеризуются отсутствием активной транскрипции и репрессирующими модификациями гистонов (Farkash-Amar *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2010; Pope *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2010). С регуляцией времени репликации наиболее тесно связано ацетилирование гистонов. Делеция гена *Rpd3*, кодирующего деацетилазу гистонов, приводит к смене времени репликации ориджинов с поздней на раннюю у *S. cerevisiae* (Vogelauer *et al.*, 2002). Увеличение уровня ацетилирования в районе одного из поздних ориджинов у *S. cerevisiae*, за счет привлечения гистонацетилтрансферазы *Gcn5*, приводит к его активации в ранней S фазе (Vogelauer *et al.*, 2002). Показано, что повышение уровня ацетилирования гистонов в районах конститутивного гетерохроматина в геноме человека приводит к ранней репликации данных районов (Casas-Delucchi *et al.*, 2012). Также стоит отметить, что для рано реплицирующихся РД характерна гиперчувствительность к ДНКазе I (Mesner *et al.*, 2013). В недавнем исследовании была создана модель, предсказывающая время репликации различных участков генома человека на основании распределения сайтов гиперчувствительных к ДНКазе I (Gindin *et al.*, 2014).

Наличие РД со значительной разницей во времени репликации предполагает наличие границ между ними. Показано, что при переходе от одного РД к другому время репликации может изменяться как плавно, так и скачкообразно (Strehl *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2000). При построении полногеномного профиля времени репликации различных типов клеток млекопитающих было установлено, что на границах РД существуют протяженные зоны, в которых не наблюдаются события инициации репликации (Farkash-Amar *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2009; Hiratani *et al.*, 2008; Ryba *et al.*, 2010). Данные районы получили название timing transition regions

(TTR). На примере локуса *Igh* мыши было показано, что в данных районах происходит ингибирование ориджинов репликации (Guan *et al.*, 2009). Однако, в другом исследовании была показана последовательная активация ориджинов в TTR и предложена модель “домино”, согласно которой деконденсация хроматина в ходе репликации способствует активации ориджинов, расположенных в TTR и гетерохроматиновых доменах с поздней репликацией (Рисунок 12) (Guilbaud *et al.* 2011).

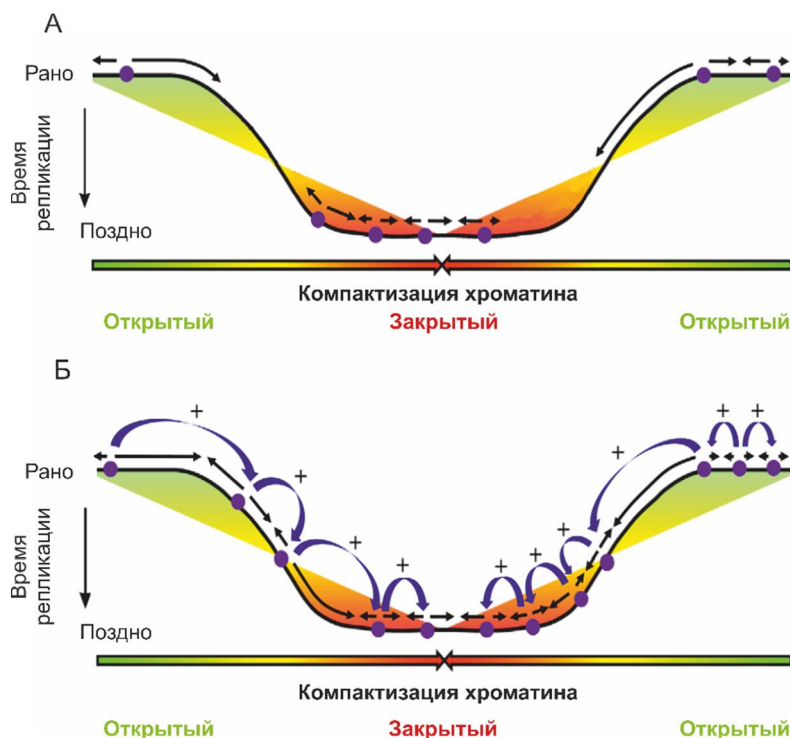


Рисунок 12. Модели репликации районов на границах ранних и поздних РД (Guilbaud *et al.* 2011). (А). Ранние и поздние РД разделены районами, которые не содержат ориджинов репликации и реплицируются пассивно. (Б). Модель домино: последовательная активация ориджинов репликации. В первую очередь активируются ориджины в ранних РД, затем деконденсация хроматина в ходе репликации способствует активации ориджинов, расположенных в TTR, в последнюю очередь активируются ориджины в поздних РД.

Профиль времени репликации генома представляет собой важную характеристику и консервативен в пределах одного типа клеток у мыши и человека (Yaffe *et al.*, 2010). В ходе развития изменения во времени репликации затрагивают около сорока пяти процентов генома мыши (Hiratani *et al.*, 2010). Наиболее значительные изменения происходят при переходе к стадии эпибласта, что совпадает с реорганизацией хроматина, компактизацией хроматина на периферии ядра, коммитированием клеток и инактивацией X-хромосомы. РД играют значительную роль в поддержания стабильности генома, поддержании

хроматиновых доменов и регуляции экспрессии генов (Hiratani, Gilbert, 2009; Lande-Diner *et al.*, 2009). Таким образом, время репликации представляет собой эпигенетическую метку и характеристику типа клетки (Hiratani, Gilbert, 2009).

Существует множество свидетельств, что регуляция времени репликации происходит на уровне РД, а не отдельных ориджинов репликации (Gilbert *et al.*, 2010; Pore *et al.*, 2010). В действительности, для многих ориджинов раннее или позднее время активации отражает усредненное поведение в популяции клеток, в то время как на уровне одной клетки активация ориджина может быть случайной и осуществляться на протяжении всей S фазы (Czajkowsky *et al.*, 2008). Случайное время активации было продемонстрировано для практически всех ориджинов *S. pombe*, примерно половины ориджинов человека и для ориджинов в раннем развитии *X. laevis* и *D. melanogaster* (Hyrien *et al.*, 1995; Mesner *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 1999). Случайное время активации ориджинов не противоречит строгой программе репликации РД. В районах с открытой структурой хроматина, содержащих много низкоэффективных ориджинов, имеется более высокая суммарная возможность для активации одного из них в ранней S фазе по сравнению с районами с малым количеством ориджинов. Данная гипотеза согласуется с полученными результатами, согласно которым репликация в ранней S фазе преимущественно инициируется в зонах репликации с открытой структурой хроматина, в основном состоящих из низкоэффективных ориджинов (Mesner *et al.*, 2013). После того, как произошла активация одного из ориджинов в пределах зоны, инициация на других ориджинах ингибируется и они реплицируются пассивно. Данный механизм имеет название интерференция ориджинов репликации и продемонстрирован у дрожжей *S. cerevisia* и человека (Brewer, Fangman, 1993; Lebofsky *et al.*, 2006). Таким образом, вышеописанные данные могут объяснить случайный набор ориджинов в отдельной клетке, равномерное распределение ориджинов в геноме и то, как случайная активация ориджинов воспроизводит временную программу РД.

1.2. Центр инактивации X-хромосомы

1.2.1. Структура центра инактивации X-хромосомы мыши и полевки

Для достижения дозовой компенсации генов у самок млекопитающих одна из двух X-хромосом в раннем эмбриогенезе претерпевает ряд изменений и становится транскрипционно неактивной (Lyon, 1961). Данный процесс получил название X-инактивация. Инактивация начинается в специфичном локусе, называемом центром инактивации, и распространяется из него вдоль всей хромосомы. Центром инактивации X-хромосомы (XIC) называют район X-хромосомы, который необходим и достаточен для нормального протекания процесса ее инактивации. При транслокации XIC локуса на аутосому, последняя приобретает способность к инактивации, в то время как X-хромосома с делецией XIC теряет способность к инактивации (Lyon *et al.*, 1986; Rastan, Robertson, 1985). В составе XIC мыши, который имеет размер около 450 т.п.н., на данный момент выявлено одиннадцать генов: *Xpct (Slc16a2)*, *Cnbp2*, *Ftx*, *Enox (Jpx)*, *Xist*, *Tsix*, *Tsx*, *Brx (Chic1)*, *Cdx4*, *Bpx*, *Ppnx*. Четыре из них кодируют нетранслируемые РНК, это гены: *Xist*, *Tsix*, *Ftx*, *Enox (Jpx)*. Ген *Xist (X inactive specific transcript)* – ключевой фактор процесса инактивации, продукт данного гена представляет собой длинную некодирующую ядерную РНК размером около шестнадцати тысяч нуклеотидов. В период инициации инактивации начинается экспрессия гена *Xist* и его продукт распространяется из центра инактивации по всей длине будущей неактивной X-хромосомы (Sun *et al.*, 2006). Это событие запускает подавление транскрипции генов и последующие изменения хроматина будущей неактивной X-хромосомы. Другой важный участник процесса X-инактивации и регулятор гена *Xist* – ген *Tsix* (Stavropoulos *et al.*, 2001). *Tsix* транскрибируется с антисмысловой цепи ДНК и его транскрипт перекрывает промотор и часть первого экзона гена *Xist*, что влияет на активность *Xist* у мыши (Luikenhuis *et al.*, 2001; Ohhata *et al.*, 2006; Shevchenko *et al.*, 2011). Ген *Enox (Jpx)* расположен на расстоянии около 10 т.п.н. выше гена *Xist* и участвует в регуляции его экспрессии (Chureau *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2013).

ХИС полевки *Microtus levis* имеет размер около 60 т.п.н. и включает четыре гена: *Enox* (*Jpx*), *Xist*, *Tsix*, *Slc7a3* (Nesterova *et al.*, 2001; Shevchenko *et al.*, 2011). В результате хромосомной перестройки из локуса ХИС полевки были удалены такие элементы, как минорный промотор гена *Tsix*, ген *Tsx* и регуляторный элемент *Xite*, которые участвуют в регуляции процесса инактивации Х-хромосомы мыши, и привнесён белок-кодирующий ген *Slc7a3* (Shevchenko *et al.*, 2011).

1.2.2. Ориджины репликации центра инактивации Х-хромосомы мыши

Проведен поиск и анализ активности ориджинов репликации генов *Tsix* и *Xist*, входящих в локус ХИС мыши (Gomez, Brockdorff, 2004). При анализе различных фракций нсДНК были выявлены ориджины репликации, располагающиеся в CGI, ассоциированных с промоторами генов *Xist* и *Tsix*. Также было показано, что данные ориджины в соматических клетках самки с кариотипом XX характеризуются близким уровнем эффективности, несмотря на то, что ген *Tsix* неактивен на обеих Х-хромосомах (Рисунок 13 А). Таким образом, было сделано заключение, что, эффективность ориджина, ассоциированного с промотором гена *Tsix*, не зависит от транскрипционной активности прилегающего участка хроматина. Дополнительное исследование данных ориджинов в линиях соматических (гены *Xist* и *Tsix* неактивны, кариотип XY) и ЭС клеток самцов (ген *Xist* неактивен, ген *Tsix* активен, кариотип XY), подтвердило результаты, полученные ранее на культуре соматических клеток самки (кариотип XX). Результаты показали, что при неактивном статусе гена *Xist*, ориджин, ассоциированный с его промотором, проявлял высокую активность в обеих клеточных линиях (соматических и ЭС), в то время как ориджин, ассоциированный с геном *Tsix* в обеих клеточных линиях имел одинаково низкую эффективность (Рисунок 13 Б, В). Было предположено, что низкая эффективность ориджина, ассоциированного с геном *Tsix*, может быть связана с импринтингом данного гена на Х-хромосоме, унаследованной от отца. Установлено, что активность ориджинов, ассоциированных с генами *Xist* и *Tsix*, не зависит от статуса метилирования CGI в промоторах данных генов. Также было показано, что данные ориджины репликации активны на обеих Х-хромосомах: активной и неактивной. Однако, ориджины, расположенные на неактивной Х-хромосоме,

инициировали репликацию в поздней S фазе, что согласуется с поздней репликацией
 всей неактивной X-хромосомы.

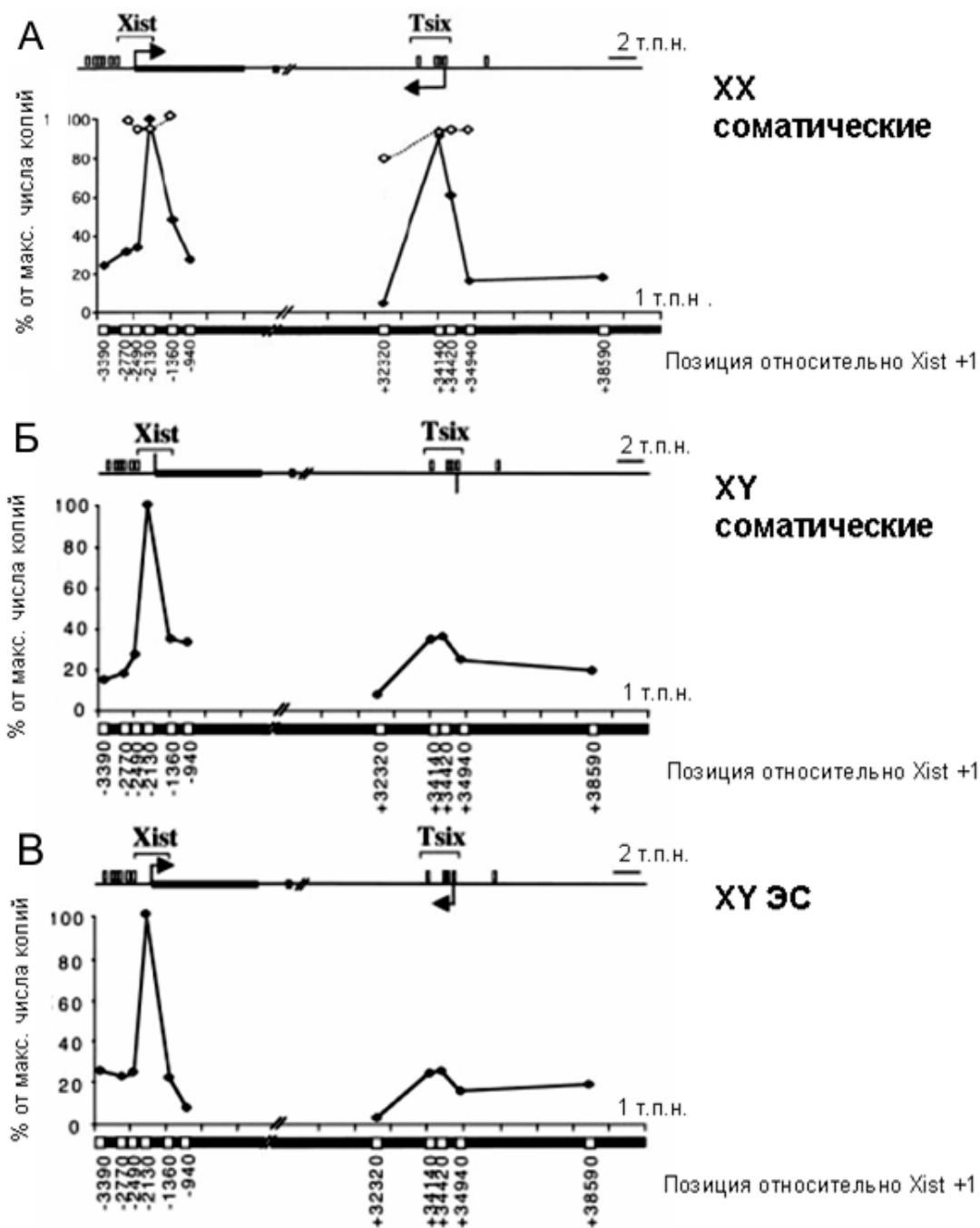


Рисунок 13. Измерение представленности фрагментов во фракции нсДНК в локусе XIC *M. musculus* (Gomez, Brockdorff, 2004).

Для каждого исследуемого сайта (белые прямоугольники ниже оси абсцисс) было проведено измерение количества нсДНК, которые включают этот сайт (черные ромбы) во фракции содержащей нити ДНК длиной 0,5-4 т.п.н. По оси ординат отложены проценты содержания нсДНК (количество геномной ДНК – 100%). На оси абсцисс отмечены нуклеотидные позиции сайтов относительно сайта старта транскрипции гена *Xist* (+ 1 нуклеотид). Для контроля было проведено измерение количества аналогичных сайтов во фракции геномной ДНК (белые ромбы на верхнем графике).

- (А). Соматические клетки самок мыши.
- (Б). Соматические клетки самцов мыши.
- (В). ЭС клетки самцов мыши.

Таким образом, было показано, что активность данных ориджинов не зависит ни от транскрипционной активности прилегающих генов, ни от статуса метилирования ДНК; ориджины, расположенные на неактивной X-хромосоме активируются позднее, нежели их гомологи на активной X-хромосоме.

Позже было проведено картирование ориджинов репликации в пределах района размером около 80 т.п.н. из локуса ХИС мыши (Rowntree, Lee, 2006). Данная зона включает гены: *Enox* (*Jpx*), *Xist*, *Tsix*, *Tsx* и *Xite* (Рисунок 14 А). Для поиска ориджинов репликации была подобрана 51 пара праймеров в этом районе, со средним интервалом в 1,5 т.п.н. между парами. Затем, с помощью анализа количества нсДНК была исследована представленность фрагментов, ограниченных праймерными парами (здесь и далее ампликонов), во фракции нсДНК размером до 1,5 т.п.н., полученной из асинхронно делящейся культуры ЭС клеток. Результаты исследования показали наличие пяти сайтов, имеющих высокую представленность в данной фракции нсДНК. Эти участки располагались: в CpG-островке, ассоциированном с промотором гена *Enox* (ампл. 3-4); в первом экзоне (ампл. 12-15) и седьмом интроне гена *Xist* (ампл. 21); в CpG островке, ассоциированном с промотором гена *Tsix* (ампл. 31); и в районе 4 т.п.н. ниже энхансера *Xite* (ампл. 35) (Рисунок 14 Б).

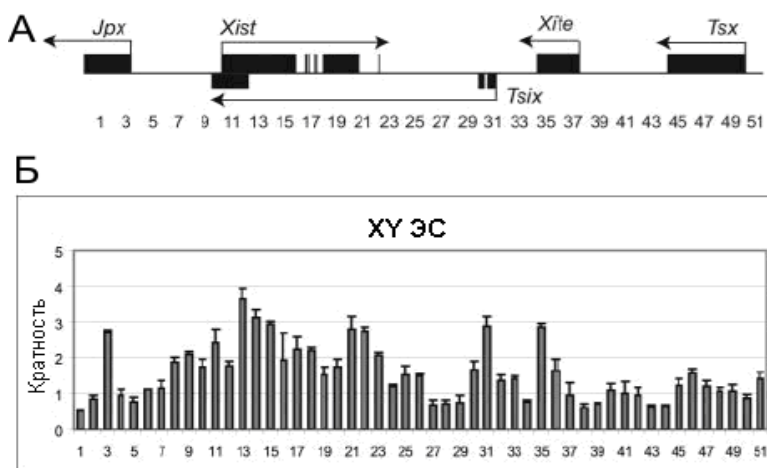


Рисунок 14. Картирование ориджинов репликации в части локуса ХИС в ЭС клетках самцов мыши (Rowntree, Lee, 2006).

(А). Схема исследуемого района. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, цифрами под схемой обозначены номера сайтов, ограниченные парами праймеров, используемых в картировании.

(Б). Паттерн нсДНК в локусе ХИС в ЭС клетках. По оси абсцисс отложен номер ампликона. По оси ординат отложено относительное обогащение нсДНК по сравнению с сайтом, локализующимся вдали от ориджина репликации (как контроль использовали район гена *c-Мус*, не содержащий ориджина).

Для подтверждения полученных результатов был использован метод ChIP с использованием антител против компонентов ORC. Несмотря на отсутствие в публикации данных анализа пятого сайта (ампл. 35), остальные результаты подтвердили данные, полученные с помощью NSAA.

После картирования пяти ориджинов репликации в исследуемом локусе, авторами был поставлен вопрос о том, изменяется ли набор активных ориджинов в процессе дифференцировки. Для ответа на этот вопрос, с помощью метода NSAA было проведено исследование активности ориджинов в популяции ЭС клеток самцов и самок мыши до, во время и после их дифференцировки в фибробласты. Результаты анализа показали, что, несмотря на уменьшение активности большинства ориджинов в процессе дифференцировки, которое объясняется, вероятно, уменьшением митотической активности культур, и некоторыми вариациями в локализации (2-3 ампликона), общий профиль активности ориджинов остается сходным с таковым до дифференцировки (Рисунок 15). Такая схожесть профиля репликации на различных стадиях дифференцировки клеток дала возможность предположить, что, независимо от стадии развития организма, в локусе Х1С мыши активируются одни и те же ориджины.

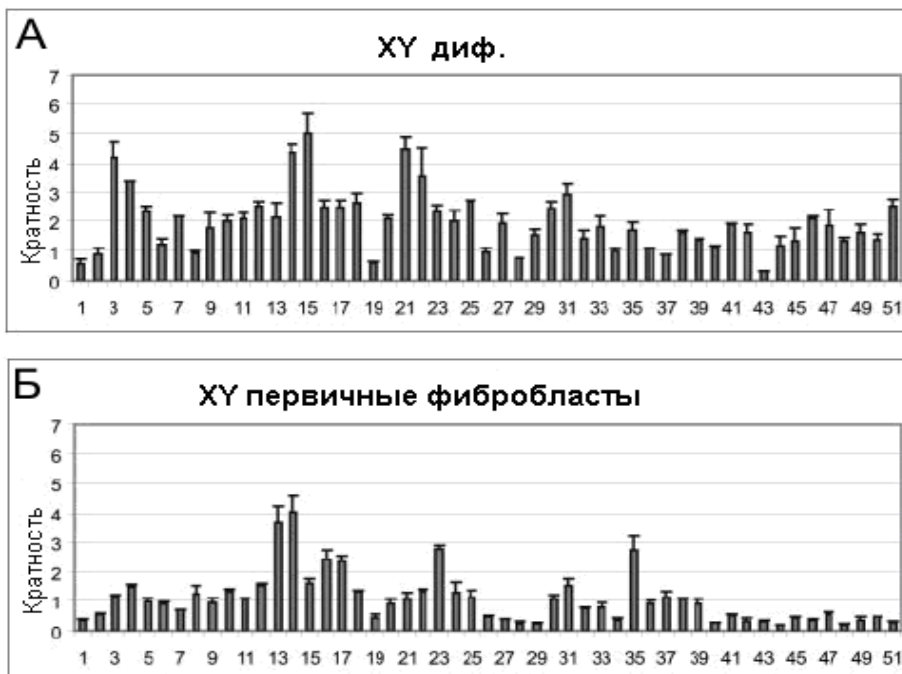


Рисунок 15. Картирование ориджинов репликации в части локуса Х1С мыши (Rowntree, Lee, 2006). По оси абсцисс отложен номер ампликона. По оси ординат отложено относительное обогащение нсДНК по сравнению с сайтом, локализующимся вдали от ориджина репликации (как контроль использовали район гена *c-Myc*, не содержащий ориджина).

(А). Дифференцированные производные ЭС клеток самцов мыши.

(Б). Фибробласты самцов мыши.

В данной работе также было проведено исследование влияния мутаций в локусе ХИС на активность ориджинов репликации. Был проанализирован эффект двух мутаций. В одном случае мутация была связана с делецией фрагмента ДНК длиной 12 т.п.н., включающего энхансер гена *Xite*, сайт инициации транскрипции этого гена и минорный ориджин (ампл. 35) (линия *Xite^{AL}*). Вторая мутация вызвана делецией фрагмента длиной 3,7 т.п.н., включающей промотор гена *Tsix*, минисателлитный повтор *DXPas34*, различные энхансеры и ранее идентифицированный ориджин в промоторе гена *Tsix* (ампл. 31) (линия *Tsix^{ACpG}*). Исследование влияния этих мутаций проводили на культуре клеток самца, в которых присутствовала только одна X-хромосома. Поскольку в более ранних работах была показана способность X-хромосомы в ЭС клетках самца инактивироваться при наличии трансгена, содержащего ХИС, исследуемая культура имела все необходимые транс-факторы, вовлеченные в инактивацию X-хромосомы (Lee *et al.*, 1996). Анализ клеток, содержащих делецию в районе гена *Xite*, методом NSAA показал значимые изменения в профиле активности ориджинов. В частности, ориджин, ассоциированный с промотором гена *Xist* (ампл. 12-15), проявил более высокую активность при дифференцировке культуры. Кроме того, было отмечено снижение эффективности ориджина в седьмом интроне гена *Xist* (ампл. 21) линии *Xite^{AL}* по сравнению с аналогичным ориджином в контроле, однако активность ориджина в культуре с делецией вернулась к исходной после дифференцировки. Подобный анализ клеток линия *Tsix^{ACpG}* выявил появление нового ориджина вблизи делеции (ампл. 28). Появление нового ориджина позволяет предположить альтернативное использование неактивных в нормальных условиях ориджинов при утрате соседних.

В результате экспериментов по анализу репликационной активности в центре инактивации X-хромосомы мыши были сделаны следующие заключения:

1. обнаруженное среднее расстояние между соседними ориджинами в локусе ХИС мыши составляет всего около 15 т.п.н;
2. в течение развития организма в локусе ХИС мыши используются, по-видимому, одни и те же ориджины репликации;
3. делеции районов в непосредственной близости к ориджинам могут влиять на их активность.

Таким образом, результаты, полученные с использованием разных методов анализа, несмотря на некоторые противоречия, сходятся в главном – расположение и эффективность ориджинов репликации в локусе ХИС мыши не зависит от стадии развития и статуса хроматина, однако мутации могут влиять на эффективность ориджинов.

1.2.3. Модификации хроматина в центре инактивации X-хромосомы мыши

В регуляции экспрессии генов центра инактивации X-хромосомы участвуют модификации гистонов, которые также могут влиять и на эффективность ориджинов репликации. В ЭС клетках ген *Xist* неактивен на обеих X-хромосомах у самок и на единственной у самцов. При этом для промотора гена *Xist* характерно триметилирование H3K9 и метилирование CpG-динуклеотидов в составе CGI (Рисунок 16) (Navarro *et al.*, 2006). В свою очередь, ген *Tsix* активен в ЭС клетках и в его промоторе наблюдаются модификации активного хроматина: H3K4me_{2,3} и H3K9ac. Для структурной части гена *Tsix* характерно диметилирование H3K4. При дифференцировке ЭС клеток самок один из аллелей гена *Xist* активируется и его промотор приобретает модификации активного хроматина: H3K9ac, H4ac и H3K4me_{2,3}. (Goto *et al.*, 2002; Marks *et al.*, 2009). Другой аллель гена *Xist* у самок и единственный у самцов при дифференцировке ЭС клеток сохраняет неактивное состояние и модификации, характерные для неактивного хроматина в районе промотора (Navarro *et al.*, 2009). Ген *Tsix* при дифференцировке ЭС клеток самок и самцов инактивируется и его промотор обогащается триметилированным H3K27 (Lee *et al.*, 1999; Marks *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2006). Аналогичный паттерн модификаций хроматина в локусе ХИС мыши был продемонстрирован в экспериментах по секвенированию ChIP реакций в ходе проекта ENCODE.

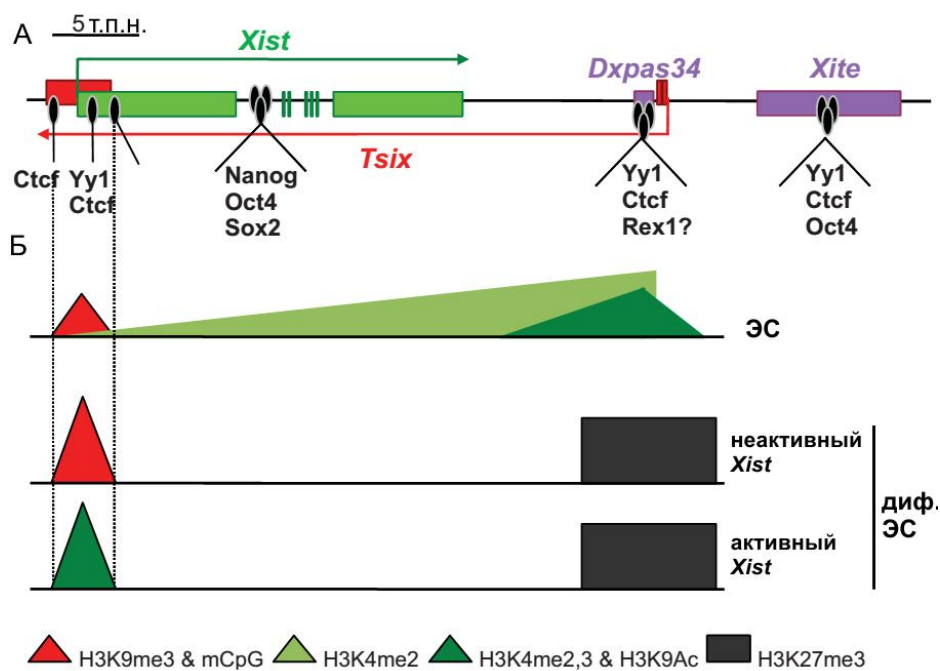


Рисунок 16. Расположение ТФ и модификаций гистонов в районе генов *Xist* и *Tsix* в ЭС клетках и их дифференцированных производных мыши (Navarro, Avner, 2010).

(А). Схема района. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, черными овалами обозначены ТФ.

(Б). Модификации гистонов в данном районе в ЭС клетках (обе X-хромосомы активны) и в дифференцированных производных ЭС клеток (одна X-хромосома активна, другая неактивна).

В заключение необходимо отметить, что ориджины репликации представляют собой важный элемент генома у всех видов, однако, их регуляция у многоклеточных изучена не полностью. В настоящее время изучаются различные аспекты процесса инициации репликации, в частности локализация ориджинов репликации в геноме. Ряд исследований направлен на установление пространственно-временной картины инициации репликации в геномах различных организмов, а также на выявление факторов и механизмов, участвующих в регуляции данного процесса. Множество ориджинов репликации было картировано в геномах мыши и человека. Однако, невысокий уровень совпадения результатов поиска ориджинов различными методами говорит о том, что данные методы не позволяют определить все ориджины в геноме. Кроме того, изучение ассоциации ориджинов с различными эпигенетическими факторами на уровне всего генома не дает представления о регуляции отдельных ориджинов в пределах зон инициации репликации. Тем не менее, в ряде работ показано влияние эпигенетических факторов, в частности структуры хроматина, и процесса транскрипции на эффективность ориджинов репликации. В некоторых работах представлено сравнение ориджинов в различных типах клеток. Однако полная картина регуляции процесса инициации репликации и эффективности ориджинов пока отсутствует. Кроме того, объекты, на которых происходит изучение данного процесса у млекопитающих, преимущественно ограничены мышью и человеком. В геномах других млекопитающих картировано лишь небольшое количество ориджинов. Центр инактивации X-хромосомы полевок представляет собой уникальную модель как для изучения процесса инактивации X-хромосомы, так и процесса инициации репликации ДНК. Данный локус содержит гены с различным статусом экспрессии и, предположительно, участки с различными модификациями хроматина. Это дает возможность проследить связь между регуляцией генов в данном локусе и расположением и эффективностью ориджинов репликации. Высокая скорость дивергенции нуклеотидных последовательностей локуса XIC в пределах отряда Rodentia позволит оценить консервативность ориджинов репликации мыши и полевки. Таким образом, картирование ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы у *M. levis* в различных типах клеток и анализ их эпигенетических характеристик позволит внести существенный вклад в

решение данных вопросов, а также позволит провести сравнительный анализ с ранее картированными ориджинами в данном локусе у мыши.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Культуральные среды, сыворотки, антибиотики, добавки

Пенициллин, раствор незаменимых аминокислот, среда F12 (Nutrient Mixture), стрептомицин, эмбриональная бычья сыворотка (FBS: fetal bovine serum), DMEM (Dullbecco's Modified Eagle Medium), L-глутамин (Life Technologies); β -меркаптоэтанол (Sigma).

2.1.2. Ферменты

РНКаза А, трипсин (Sigma); протеиназа К (Roche); ДНК-полимераза Taq (Медиген); обратная транскриптаза M-MLV (Promega).

2.1.3. Реактивы

Акриламид, бромистый этидий, глицин, диметилсульфоксид (ДМСО), желатин, ксиленицианол, лаурилсаркозинат натрия, люминол, п-кумаровая кислота, смесь dNTP, трис-HCl, трис, формальдегид, хлорид калия, этиленгликольтетраацетат (ЭГТА), желатин из кожи рыб, обитающих в холодной воде, Igepal® CA-630, N,N'-метилен-бис-акриламид, TEMED, Triton X-100 (Sigma); агароза, ацетат натрия, хлорид натрия (Хеликон); бычий сывороточный альбумин, маркер молекулярного веса ДНК (1kb DNA ladder), dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Медиген); бромфеноловый синий, гидроксид натрия, изопропанол, метанол, персульфат натрия, фенол, хлорид лития, хлороформ, этанол (Реахим); перекись водорода (Прохим); глицерин, додецилсульфат натрия (SDS: sodium dodecyl sulfate), сульфат аммония, хлорид магния (BDH); дезоксихолат натрия (AppliChem); магнитные шарики, конъюгированные с белком G, HEPES, гексадезоксирибонуклеотиды произвольной последовательности, TRI REAGENT (Life Technologies); фиколл (Pharmacia); этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (Serva); ингибиторы протеаз (PIC: protease inhibition cocktail) (Roche); DAPI в Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories); Tween-20 (Ferak); полилизинные стекла

(Thermo Scientific); нитроцеллюлозная мембрана (Bio-Rad); ингибитор РНКаз RNAsine (Promega).

2.1.4. Растворы и буферы

5×RT-буфер (Life Technologies).

Блокирующий буфер для вестерн блот-гибридизации (1% желатин из кожи рыб, обитающих в холодной воде, 0,1% Tween-20 в PBS).

Блокирующий буфер для ChIP (0,5% бычий сывороточный альбумин в PBS).

Буфер для нанесения образцов для электрофореза по Лэммли, двукратный (100 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 200 мМ β-меркаптоэтанол, 2% SDS, 0,005% бромфеноловый синий, 20% глицерин).

Буфер для переноса белков на мембрану (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0,0385% SDS, 20% метанол).

Буфер для элюции для ChIP (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ ЭДТА, 1% SDS).

Десятикратный буфер для ДНК-полимеразы Taq №1 (166 мМ (NH₄)₂SO₄; 650 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 0,1% Tween-20).

Десятикратный буфер для ДНК-полимеразы Taq №2 (650 мМ трис-НСl, рН 8,8, 160 мМ (NH₄)₂SO₄, 60 мМ MgCl₂, 0,5% Tween-20).

Концентрирующий полиакриламидный гель (5% раствор акриламида, 130 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 0,1% SDS, 1 мг/мл персульфата натрия, 0,05% TEMED)

КСМ буфер (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 120 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА).

Лизирующий буфер №1 для ChIP (50 мМ HEPES-КОН, рН 7,5, 140 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10% глицерин, 0,5% Igepal® CA-630, 0,25% Triton X-100, PIC).

Лизирующий буфер №2 для ChIP (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ЭГТА, PIC).

Лизирующий буфер №3 для ChIP (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ЭГТА, 0,1% дезоксихолат натрия, 0,5% лаурилсаркозинат натрия; PIC).

Нейтрализующий буфер (0,5 М Трис-НСl, рН 8,0, 0,5 мМ ЭДТА).

Отмывочный буфер для ChIP (50 мМ HEPES-КОН, рН 7,5, 500 мМ LiCl, 1 мМ ЭДТА, 1% Igepal® CA-630, 0,7% дезоксихолат натрия).

Разрешающий полиакриламидный гель (10-15% раствор акриламида, 375 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 0,1% SDS, 0,5 мг/мл персульфата натрия, 0,033% TEMED)

Раствор А (68 мМ п-кумаровая кислота в ДМСО).

Раствор Б (100 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 1,25 мМ люминол).

Раствор акриламида, 30% (29% акриламид, 1% N,N'-метилен-бис-акриламид).

Трис-глициновый буфер для электрофореза по Лэммли (25 мМ Трис, 125 мМ глицин, 0,1% SDS).

Фосфатно-солевой буфер (PBS) (1 М NaH_2PO_4 , 1 М Na_2HPO_4 , рН 7,2) (Биолот).

Щелочной буфер для электрофореза (50 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА).

ТАЕ буфер (40 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА).

ТЕ буфер (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА).

2.1.5. Наборы

ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Life Technologies); MinElute PCR Purification Kit, QIAquick gel extraction kit (Qiagen); TURBO DNA-free (Ambion); GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma).

2.2. 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].

2.3. Методы

2.3.1. Методы работы с клеточными культурами

2.3.1.1. Состав культуральных сред и условия культивирования

Ростовая среда для фибробластов:

- 1) 44% среды F12 (Nutrient Mixture)
- 2) 44% среды DMEM;
- 3) 10% эмбриональной бычьей сыворотки;
- 4) 1 мМ L-глутамин;
- 5) 50 ед/мл пенициллин;
- 6) 50 ед/мл стрептомицин.

Ростовая среда для клеток XEN:

- 1) 40% среды F12 (Nutrient Mixture);
- 2) 40% среды DMEM;
- 3) 15 % эмбриональной бычьей сыворотки;
- 4) 1× раствор незаменимых аминокислот;
- 5) 1 мМ L-глутамин;
- 6) 50 ед/мл пенициллин;
- 7) 50 ед/мл стрептомицин.

Ростовая среда для ТС клеток:

- 1) 40% среды F12 (Nutrient Mixture);
- 2) 40% среды DMEM;
- 3) 15 % эмбриональной бычьей сыворотки;
- 4) 1× раствор незаменимых аминокислот;
- 5) 1 мМ L-глутамин;
- 6) 50 ед/мл пенициллин;
- 7) 50 ед/мл стрептомицин;
- 8) 0,1 мМ β-меркаптоэтанол.

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.

2.3.1.2. Замораживание клеток

Для заморозки клетки снимали, как при пересадке, центрифугировали 5 мин. при 1000 об/мин., супернатант сливали. Для фибробластов добавляли раствор, содержащий 10% ДМСО, 40% FBS и 50% ростовой среды, а для ТС клеток и клеток XEN – 10% ДМСО и 90% FBS. Осадок аккуратно ресуспендировали и заливали суспензию в ампулы для заморозки клеток. Для медленного замораживания клеток ампулы в специальных боксах с изопропанолом помещали в кельвинатор на -70°C . Для хранения ампулы с клетками переносили в жидкий азот.

2.3.1.3. Размораживание клеток

Ампулы с клетками быстро размораживали при 37°C . Суспензию клеток переносили в коническую пробирку с культуральной средой и центрифугировали 5 мин. при 1000 об/мин. и комнатной температуре. Далее супернатант сливали, клетки ресуспендировали в ростовой среде и переносили в культуральную емкость.

2.3.2. 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 мМ NaOH, 1 мМ 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.

2.3.3. Иммунофлуоресцентное окрашивание ядер клеток

Для иммунофлуоресцентного окрашивания использовались фибробласты самцов *M. levis*. Фибробласты пересаживали на полилизиновые стекла. Полученные препараты фиксировали в 4% формальдегиде 10 мин., пермеабелизовали в растворе 0,5% Triton X-100 в КСМ буфере при 4°C и отмывали в PBS 2 раза по 5 мин.

Далее препараты инкубировали при комнатной температуре 30 мин. с блокирующим буфером (10 мг/мл раствор бычьего сывороточного альбумина в PBS), 2 часа с первичными антителами и 40 мин. со вторичными антителами. Первичные и вторичные антитела, использованные в данной работе, приведены в Таблице 1. От несвязавшихся антител препараты отмывали при комнатной температуре 3 раза по 5 мин. в КСМ/0,1% Tween-20. Для общего окрашивания препаратов использовался DAPI в Vectashield Mounting Medium. Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе NIKON X100 с помощью программного обеспечения фирмы Imstar.

2.3.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Для электрофореза использовали белковые экстракты, полученные путем лизиса фибробластов *M. levis* буфером для нанесения образцов, содержащим SDS. После лизиса клеток образцы инкубировали 5 мин. при 95°C, затем центрифугировали при 14,000 об/мин., 5 мин. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере сначала в 5% концентрирующем, затем в 10-15% разделяющем полиакриламидном геле, в зависимости от размера белка, при 10 В/см в концентрирующем геле и 18 В/см в разделяющем геле.

2.3.5. Вестерн блот-гибридизация

После проведения электрофореза белки из полиакриламидного геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для этого гель предварительно инкубировали в буфере для переноса 10 мин. Мембрану сначала инкубировали 5 мин. в воде, затем 5 мин. в буфере для переноса. Перенос осуществляли на приборе Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) в течение 25 мин. с ограничением по силе тока 2 мА/см². После переноса мембрану ополаскивали в PBS. Далее мембрану инкубировали при комнатной температуре 40 мин. в блокирующем буфере, 2 часа с первичными антителами и 50 мин. со вторичными антителами. Первичные и вторичные антитела, использованные в данной работе, приведены в Таблице 1. От несвязавшихся антител препараты отмывали при комнатной температуре 3 раза по 5 мин. в блокирующем буфере. Детекцию сигналов осуществляли с использованием хемилюминесценции. Для этого смешивали 140 мкл раствора А, 14 мл раствора Б и 5 мкл 30% H₂O₂. Данный раствор наносили на мембрану, инкубировали 1 мин., затем мембрану либо экспонировали с рентгеновской пленкой AGFA, либо фотографировали на приборе Multispectral FX In Vivo System (Bruker).

Таблица 1. Характеристика первичных и вторичных антител, используемых при иммунофлуоресцентном окрашивании (ИФ), вестерн блот-гибридизации (ВБ) и ChIP.

Антитела	Тип	Источник	Каталожный номер	Разведение		
				ВБ	ИФ	ChIP
Первичные антитела						
Анти-ORC4L	козы поликлональные	Abcam	ab9641	1:250		1:250
Анти-Н3	кроличьи моноклональные	Upstate (Millipore)	05-928	1:10000		1:250
Анти-Н3.3	кроличьи поликлональные	Upstate (Millipore)	09-838	1:1000		1:250
Анти-Н3К9ас	кроличьи поликлональные	Abcam	ab4441		1:200	1:125
Анти-Н4К20me1	кроличьи поликлональные	Abcam	ab9051	1:1000		1:100
Анти - Н3К27me3	кроличьи моноклональные	Upstate (Millipore)	07-449			1:250
Вторичные антитела						
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (H+L)	козы поликлональные	Molecular Probes (Life Technologies)	A11008		1:400	
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)- Peroxidase	козы поликлональные	Sigma	A0545	1:10000		
Anti-Goat IgG (whole molecule)- Peroxidase	кроличьи поликлональные	Sigma	A5420	1:2500		

2.3.6. Иммунопреципитация хроматина (ChIP)

ChIP проводили согласно протоколу (Lee *et al.*, 2006), с некоторыми модификациями. Для получения хроматина из культуры фибробластов самцов *M. levis* клетки ($\sim 10^7$ 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 и инкубировали в течение 5 мин. при постоянном перемешивании. Далее добавляли 1 мл 1,25 М раствора глицина, инкубировали в течение 5 мин. при постоянном перемешивании и центрифугировали 5 мин. при $400\times g$ и $4^{\circ}C$. Полученный осадок дважды промывали PBS, $4^{\circ}C$, затем клетки осаждали 5 мин. при $700\times g$ и $4^{\circ}C$, полностью отбирали

супернатант. Клетки лизировали до ядер добавлением 1 мл лизирующего буфера №1 для ChIP в течение 10 мин. на льду при постоянном перемешивании. Затем ядра осаждали 5 мин. при $1350 \times g$ и $4^\circ C$, 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. Далее 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 $16,000 \times g$ и $4^\circ C$. Супернатант переносили в чистую пробирку. Для хранения хроматин замораживали в жидком азоте и хранили при $-70^\circ C$.

Для определения длины фрагментов хроматина после обработки ультразвуком брали аликвоту 20 мкл, добавляли 80 мкл воды, 4 мкл 5 М NaCl и инкубировали при $95^\circ C$ 15 мин. После остывания образца до комнатной температуры добавляли РНКазу А, конечная концентрация 200 мкг/мл, и инкубировали при $37^\circ C$ 10 мин. К полученному раствору добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ (1:1), перемешивали и центрифугировали 10 мин. при 12,000 об/мин. Верхнюю водную фазу с ДНК переносили в чистую пробирку. Добавляли равный объем 100% изопропанола, перемешивали и осаждали ДНК центрифугированием 15 мин. при $16,000 \times g$. Супернатант отбирали, осадок ДНК промывали 75% этанолом, затем подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 10 мкл воды. ДНК анализировали в 2% агарозном геле. Размер фрагментов определяли в соответствии с маркером молекулярного веса ДНК.

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, для этого хроматин разбавляли лизирующим буфером №3, содержащим 1% Triton X-100. Далее к хроматину добавляли антитела и инкубировали в течение 16 часов при $4^\circ C$ и постоянном перемешивании. Для положительного контроля параллельно

проводили реакцию с антителами против гистона H3, а для отрицательного – реакцию без антител. Также отбирали количество хроматина, соответствующего 2 миллионам клеток, и очищали как описано далее (Input хроматин). После инкубации хроматина и антител к образцам добавляли 20 мкл магнитных шариков, предварительно дважды промытых в 1,5 мл блокирующего буфера для ChIP. Инкубировали 6 часов при 4°C. Далее образцы промывали 5 раз в 1 мл отмывочного буфера для ChIP и 1 раз в 1 мл буфера TE, содержащем 50 mM NaCl. Затем магнитные шарики центрифугировали 3 мин. при 960×g и 4°C, отбирали остатки буфера и добавляли 200 мкл буфера для элюции. Элюцию хроматина проводили в течение 30 мин. при 65°C, периодически перемешивая. Далее магнитные шарики осаждали центрифугированием в течение 1 мин. при 16,000×g. Супернатант, содержащий хроматин, переносили в чистую пробирку и инкубировали от 6 до 15 часов при 65°C. На данном этапе к Input хроматину добавляли 3 объема буфера для элюции и далее инкубировали вместе с остальными образцами. Далее 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. После, образцы очищали с использованием набора MinElute PCR Purification Kit в соответствии с инструкцией производителя. Для этого к образцам добавляли 5 объемов буфера РВ и 10 мкл 3 М ацетата натрия, рН 4,8. Затем содержимое пробирки переносили на колонку и центрифугировали 1 мин. при 13,000 об/мин. Осадок ДНК на колонке промывали 750 мкл буфера РЕ. Для более эффективного промывания колонку оставляли с буфером РЕ на 2-5 мин. при комнатной температуре, после центрифугировали два раза для более полного удаления спирта. ДНК растворяли в 30 мкл воды в течение 5 мин., центрифугировали 1 мин. при 13,000 об/мин., собирая очищенную ДНК в новую 1,5 мл пробирку.

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).

2.3.7. Выделение РНК

РНК была выделена из культуры фибробластов самцов *M. levis* с помощью TRI REAGENT согласно инструкции фирмы производителя. Осадок клеток, собранных с 75 см² культуральной емкости гомогенизировали пипетированием в 1 мл раствора TRI REAGENT до полного лизиса. К лизату добавляли 0,2 мл хлороформа, тщательно перемешивали в течение 15 сек. и оставляли на 2-15 мин. при комнатной температуре. Полученную смесь центрифугировали 15 мин. при 12,000×g и 4°C. Верхнюю водную фазу с РНК переносили в чистую пробирку. Добавляли 0,5 мл 100% изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5-10 мин. РНК осаждали центрифугированием 10 мин. при 12,000×g и 4°C. Супернатант отбирали, осадок РНК дважды промывали 75% этанолом, затем подсушивали при комнатной температуре и растворяли в 50 мкл воды.

Для очистки образцов РНК от контаминаций ДНК использовали набор реагентов TURBO DNA-free. К полученному раствору РНК добавляли 0,1 объема 10×DNaseI буфера, 2 ед. DNaseI и инкубировали 30 мин. при 37°C. Затем к смеси добавляли 0,1 объема DNase Inactivation Reagent, инкубировали 2 мин. при комнатной температуре и центрифугировали 1 мин. при 11,500 об/мин. Супернатант, содержащий РНК, переносили в свежую пробирку и хранили при -70°C.

2.3.8. Синтез кДНК методом обратной транскрипции

Для проведения одной реакции обратной транскрипции (20 мкл) смешивали

- 1) РНК – 2 мкг;
- 2) гексадезоксирибонуклеотиды произвольной последовательности – 50 пмоль;
- 3) H₂O – до 10 мкл.

Полученную смесь инкубировали 2 мин. при 70°C, затем переносили на лед на 2 мин. Быстро центрифугировали и возвращали на лед. После чего добавляли оставшиеся реагенты:

- 4) смесь dNTP по 10 мМ каждого – 4 мкл;
- 5) 5×RT-буфер – 4 мкл;

6) обратная транскриптаза M-MLV – 1 мкл (чтобы проверить образцы на контаминацию ДНК, ставили контрольную реакцию, в которую вместо фермента добавляли воду);

7) ингибитор РНКаз RNAsine – 1 мкл.

Смесь инкубировали 15 мин. при комнатной температуре, затем 60 мин. при 42°C, затем 10 мин. при 94°C для инактивации обратной транскриптазы и хранили при -20°C.

2.3.9. Подбор праймерных пар

Подбор праймерных пар осуществляли с использованием программы Oligo, версия 6.71. Для подбора праймеров использовали последовательность ДНК центра инактивации обыкновенной полевки *Microtus levis*, зарегистрированную в базе данных EMBL под регистрационным номером [AJ310130].

Параметры отбора праймеров:

- Длина: 20-30 нуклеотидов
- Температура отжига: 58 - 60°C
- GC состав: 20-80%
- Минимум G/C на 3' конце (не более 3 из 5 нуклеотидов 3' конца)
- Длина ПЦР продукта не более 120 нуклеотидов

Параметры отбора зонда:

- GC состав: 20-80%
- Температура отжига: 68-70°C
- Избегать G на 5' конце
- Выбирать цепь, которая содержит больше C чем G
- Избегать идущих подряд одинаковых нуклеотидов (особенно G: не более 4)

Последовательности праймеров и зондов приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Список олигонуклеотидов, использованных для анализа нсДНК и реакций ChIP.

Сайт	Последовательность олигонуклеотидов, для амплификации (5'-3')	Последовательность олигонуклеотидов, для детекции продуктов в реакциях ПЦР в реальном времени (5'-3')	Температура отжига, °С
1	ctaaaacataaagttcattttaac agcttggttacattaagttggag	tgtcacccgatacatatcatggga	60
2	acaatggctacgccagcta acacaggcagatttttagagg	cggaagccgccgtgactatccg	60
3	acattgtccgctaaaggctgc tcctcttgtgtggcaagggttac	ccctcccaatctggcagggccag	60
4	atcctctgggctgtgccagaagg tgtcaggaggggagagagaa	cccactttgtctaaccgggtctcc	60
5	ggcatgtatgtgtaaagggtg tggaacactgagatgtgat	catcgccgtctgtaagatgtcca	58
6	cttgctagcagcggtagaga tttcaatgaataaaattggacaatt	ctcagcggtagggcacttgcctag	56
7	ttccatctctgttttgcceatg aaaagcaggtacgtttccacagc	tgtctgtcctccttccctgccc	60
8	gtgtgtgggttggacttgat cacataacaccacacatgaaca	tctgattccagttaccatgagtetta	60
9	gccgtatttagtccactgctg cctctggccaaggtttattctg	cccacagcaggcctggagaact	60
10	gagcctgggctgacacttaattc aggacaaatgcagctgtgcacat	cgggcattgtcaccgcttctgcc	56
11	cccactgtgcctttcatttggac gcctctgatgtcaaggaggtagc	acgcagttgtccatccttacctttgg	60
12	atgaacacagcaccgatggacag tgettcacacctagctttggc	tgcagcccatgtgtcccagagctcc	60
13	ccctataatgtagccactgc cagatctccccaggagtga	tcccagtccaaggagcctgttctgc	56
14	cccttagcgtttgacacgagga tgtcctcatccttatggctcctc	ttgcacctgcagagctccaggat	60
15	atgagggtcctccaggggaata cttgccgggttcagcgaagtgt	cccggctaggactgttggccag	60
16	gtcctgtccagtgtcaggta gtattgtagtagcatctgacg	cctgtccttctgttccctgacgtcc	60
17	cttaggattatccctgggggaa ggcagttctatgccttggcatgt	cccattcttgagctgcagcagggc	58
18	ccaatgctgacatccacaaatgg tgtgtctgttggccaacttagt	cccagacctcttcaacctggctc	54
19	gaaatggaatggactgctgctgg ccctcctctgtatgaggcaact	agaggcccttctctactcagc	60
20	gaaataggatagaactcatcacc gtctgaaccaccaccacac	tcttctctgcttaacctctgg	58
21	tacgtacatggaactaacactgt ctagaggacacgtggacttetta	tccacacatgtggcaacctagggc	60
22	aggcatgcctgtaccagtacat tctgtcttccactctttagag	catcaaacactcaccagactgtctg	58

Таблица 2 (продолжение). Список олигонуклеотидов, использованных для анализа нсДНК и реакций ChIP.

Сайт	Последовательность олигонуклеотидов, для амплификации (5'-3')	Последовательность олигонуклеотидов, для детекции продуктов в реакциях ПЦР в реальном времени (5'-3')	Температура отжига, °С
23	aacttcagggcctttcttg gccaaccsaaagcatggattcg	ctcagttgcttcacatgctgccagc	60
24	ttcacctgtctctctgggtagcg gcccaaacctgggacaaaagtta	ttccctgctcggtttcccgaaca	60
25	cactttgatcagggcaggaacag agaactccatttagacaggacc	tgctgggctgactcacctccgc	58
26	atgtgaacaaggtagagaacgagc cgtgactgggaaggtaatgagg	tcgcgactaggccctgcacactc	58
27	tgcagaactggcataaatactcc gcctgtgtgtaaggaagggatag	ctccctgccctggcttcccagct	58
28	gcctccattcccagaagggttac gtttggagaagcccagcttgaca	cctctctctcaccgaatgccgcc	58
29	ccagctttgtggctctctaacc ccgaagaactggagcctcaca	tgggtccacccatggtcaagca	58
30	acctcgctgcaggttaaaagtgg cctaaggcaggcgggaggaagtg	ccctcctcaccsagccsacagcg	58

2.3.10. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для проведения одной реакции (25 мкл) смешивали:

- 1) dATP, dTTP, dCTP, dGTP (10 mM каждый) – 1 мкл;
- 2) 10x буфер для ДНК-полимеразы Taq №1 – 2,5 мкл;
- 3) MgCl₂ (25 mM) – 3-6 мкл;
- 4) Матрица – 10-100 нг геномной ДНК;
- 5) ДНК-полимераза Taq (1 ед./мкл) – 1 мкл;
- 6) Праймеры – (10 mM каждый) – по 2 мкл;
- 7) H₂O – до 25 мкл.

В пробирку с ДНК-матрицей и праймерами добавляли реакционную смесь, содержащую остальные компоненты, и помещали в амплификатор. Реакцию проводили на амплификаторе GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). Программа: 95°C – 10 мин., 40 циклов: 95°C – 15 сек., 58-60°C – 1 мин (в случае коротких продуктов, до 120 п.н.), либо 95°C – 30 сек., 58-60°C – 30 сек., 72°C – 30-40

сек. в зависимости от размера продукта (1 мин. на 1 т.п.н.). Более подробно условия ПЦР представлены в Таблицах 2 и 3.

Таблица 3. Список праймеров, использованных для анализа экспрессии генов (Dementyeva *et al.*, 2010; Shevchenko *et al.*, 2011).

Ген	Последовательность олигонуклеотидов (5'-3')	Название	Концентрация ионов Mg ²⁺ , мМ	Температура отжига
<i>β-actin</i>	gatacgcctgcgctggctcgt agatcttctccatgctcgtcc	BA11S BA2	3	60
<i>Xist</i>	ttgctcagattagctag gtgattaattcattctatctgc	MSX27 NSX19	4	48
<i>Tsix</i>	ccatgtgacattgctgatgaaacc ctctccctgcgctccctcac	SNTF SNTR	3	60
<i>Slc7a3</i>	gtctgggtagggttgatgattct ccattgtggccactgtggtatct	Slc13F2 Slc7A3R3	6	60

2.3.11. ПЦР в реальном времени

Для проведения одной реакции (30 мкл) смешивали:

- 1) 10x буфер для ДНК-полимеразы Taq №2 – 3 мкл;
- 2) dATP, dTTP, dCTP, dGTP (2,5 мМ каждый) – 3 мкл
- 3) Праймеры (10 мМ каждый) – 0,9 мкл;
- 4) Зонд (10 мМ, 5' – Тамра, 3' – BHQ2) – 0,75 мкл;
- 5) Матрица – 5 мкл выделенной и разбавленной до 1 мл нсДНК, количество которой по оценкам составляет около 10 нг на 10⁸ клеток (Cadoret *et al.*, 2008);
- 6) ДНК-полимераза Taq (1 ед./мкл) – 0,6 мкл;
- 7) 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 10x).

При анализе ДНК, полученной в реакции иммунопреципитации хроматина, представленность целевой ДНК последовательности определяли сравнением значения C_p в каждом образце со стандартной кривой, полученной из 4 точек серийного разведения Input ДНК (множитель разведения 5x). Все ПЦР-реакции были повторены два раза. В качестве отрицательного контроля вместо матрицы в реакцию добавляли H_2O . Статистический анализ результатов ПЦР анализа ChIP реакций проводили с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера.

2.3.12. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Фрагменты ДНК разделяли в 1,5-3% агарозном геле, приготовленном на буфере TAE с добавлением бромистого этидия (0,01 мкг/мл). В гель наносили образцы, содержащие 0,3-0,5 мкг ДНК, с добавлением 0,1 объема буфера, содержащего 15% фикола и 0,025% ксиленианола. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 3-7 В/см. После электрофореза гель фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью Gel Doc XR+ System (Bio-Rad).

2.3.13. Выделение фрагментов ДНК из гелей

Предварительно проводился щелочной электрофорез для выделения нсДНК, либо препаративный электрофорез в 3% агарозном геле для последующего секвенирования ПЦР-продуктов. Для секвенирования ПЦР-продуктов вырезали фрагмент геля, содержащий интересующую фракцию ДНК, эта процедура проводилась в длинноволновом ($\lambda=360$ нм) ультрафиолетовом свете.

Выделение ПЦР-продуктов из 3% агарозного геля проводили согласно инструкции к QIAquick Gel Extraction Kit с некоторыми модификациями. Фрагмент геля, содержащий ПЦР-продукт нужного размера, помещали в предварительно взвешенную 1,5 мл пробирку и определяли массу геля. В пробирку добавляли буфер QC (300 мкл на 100 мг геля) и инкубировали 10 мин. при 50°C. При очистке нсДНК добавляли 10 мкл 3 М ацетата натрия, pH 4,8. Затем содержимое пробирки

переносили на колонку и центрифугировали 1 мин. при 13,000 об/мин. Осадок ДНК на колонке промывали 500 мкл буфера QC и 750 мкл буфера PE. Для более эффективного промывания колонку оставляли с буфером PE на 2-5 мин. при комнатной температуре, после центрифугировали два раза для более полного удаления спирта. ДНК растворяли в 30-40 мкл воды в течение 5 мин., центрифугировали 1 мин. при 13,000 об/мин., собирая очищенную ДНК в новую 1,5 мл пробирку.

2.3.14. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Для проведения одной секвенирующей реакции смешивали:

- 1) праймер – 5 пмоль;
- 2) BigDye Dideoxy Terminators Version 3.1 – 2 мкл;
- 3) ПЦР-продукт – 0,1 мкг;
- 4) MilliQ H₂O – до 5,5 мкл.

Секвенирующую реакцию проводили на амплификаторе GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) при следующих условиях: 95°C – 2 мин.; 95°C – 15 сек., 53°C – 20 сек., 60°C – 4 мин. (20 циклов). После окончания реакции добавляли 30 мкл воды, 4 мкл 3 М ацетата натрия, 60 мкл 100% изопропанола. Содержимое пробирки тщательно перемешивали. ДНК осаждали в течение 10 мин. при 14,000 об/мин. Осадок промывали 70% этанолом и сушили 30 мин. при 37°C.

Определение нуклеотидной последовательности проводили согласно протоколу ABI PRISM BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на автоматическом секвенаторе в Межинститутском центре секвенирования ДНК (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Результаты секвенирования ПЦР-продуктов анализировались с помощью программы SeqMan (DNASTAR).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Картирование ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы самцов полевки *M. levis*

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

Картирование активных ориджинов репликации в локусе XIC *M. levis* было проведено в ТС клетках, клетках XEN и фибробластах. Линия клеток XEN – производная клеток гипобласта эмбриона на 3,5 день развития. Данные клетки считаются стволовыми и характеризуются высокой пролиферативной активностью, что позволяет им, в совокупности с другими клетками, сформировать в ходе развития эмбриона желточный мешок за относительно короткий промежуток времени (Rossant, 2007). ТС-клетки образуются на стадии поздней морулы при первичном процессе дифференцировки. Данный тип клеток, наряду с внутренней клеточной массой, представляет собой наиболее раннюю клеточную популяцию предимплантационного эмбриона и участвует в образовании всех типов клеток плаценты (Rossant, 2007). Фибробласты – это клетки соединительной ткани, основная функция которых – это поддержание данного типа ткани и синтез внеклеточного матрикса. Они имеют низкую скорость пролиферации и ограниченное число делений. 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, одна из которых у самок млекопитающих подвергается процессу инактивации.

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 XIC *M. levis* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени, детекцию продуктов амплификации осуществляли с использованием зондов TaqMan. На первом этапе

работы последовательность локуса ХИС *M. levis* была проанализирована на наличие повторенных последовательностей ДНК с помощью программы RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>). Было выявлено, что около 12 т.п.н. приходится на повторенные последовательности: LINE, SINE, минисателлиты. В дальнейшем данные районы были исключены при подборе праймерных пар. На свободные от повторенных последовательностей ДНК районы ХИС *M. levis* было подобрано тридцать пар праймеров (Таблица 2, Рисунок 17). Праймерные пары подбирали с учетом условий, приведенных в главе “Материалы и Методы” (Раздел 2.3.9), с некоторыми исключениями. Не удалось подобрать праймеры на район с пятого по седьмой экзоны гена *Xist*. Работоспособность всех пар праймеров была подтверждена на геномной ДНК *M. levis*. Продукты каждой реакции анализировали с помощью электрофореза в 3% агарозном геле. Проведено секвенирование полученных ПЦР-продуктов. Показано, что последовательности всех ПЦР-продуктов с точностью до одного нуклеотида соответствуют последовательности локуса ХИС *M. levis*, зарегистрированной в базе данных EMBL под номером [AJ310130]. Для каждой пары подобран зонд, комплементарный участку, ограниченному данной парой праймеров. Для всех систем (пара праймеров и зонд) была определена оптимальная температура отжига (Таблица 2).

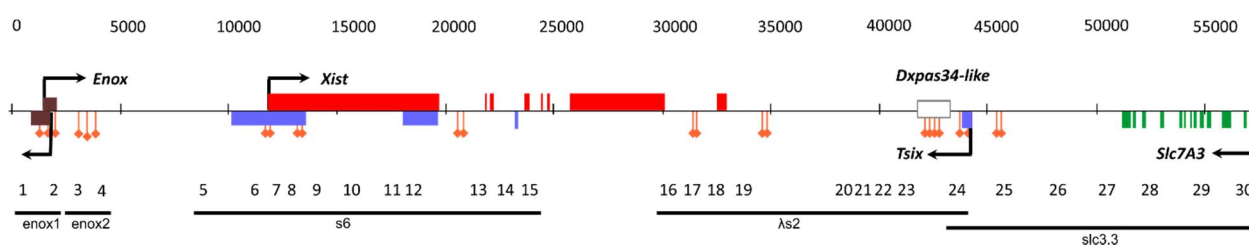


Рисунок 17. Схема исследуемого района. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками. Цифрами внизу обозначено расположение пар праймеров, используемых в работе, черными линиями – расположение клонов: epoch1, epoch2, λ s2, s6, slc3.3 (Nesterova *et al.*, 2001), используемых для построения стандартной кривой в реакциях количественной ПЦР.

нсДНК размером от 750 до 1500 п.н. выделяли из асинхронно делящихся культур клеток. Использование асинхронно делящейся культуры клеток позволяет выявить ориджины репликации, активирующиеся на различных этапах S фазы. Нижняя граница длины нсДНК должна превышать длину фрагментов Оказаки, наличие которых в образце приводит к увеличению фона. Максимальная длина

нсДНК, используемая в различных работах по картированию ориджинов репликации не превышает 2 т.п.н., что позволяет относительно точно определить район, содержащий ориджин репликации. Количество нсДНК в каждой точке определяли по методу стандартной кривой. Для ее построения использовали рекомбинантные ДНК на основе фагамиды pBluescript II SK (+), содержащие в качестве встроок фрагменты ДНК локуса ХИС *M. levis*, известной концентрации (Рисунок 17) (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 случае ТС и XEN клеток минимальное обогащение нсДНК наблюдается в сайте 16, в фибробластах – в сайте 5. При этом в фибробластах в сайте 16 и в ТС и XEN клетках в сайте 5 обогащение нсДНК близко к единице и, соответственно, не превышает порог, заданный для определения ориджина репликации. Таким образом, можно предположить, что данные районы не содержат активных ориджинов репликации и могут быть использованы для нормировки количества нсДНК. 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. Десятикратное обогащение нсДНК по сравнению с районами, не содержащими ориджины репликации, используется в качестве одного из критериев ориджина в литературе (Valenzuela *et al.*, 2011). Однако при анализе паттерна нсДНК в XEN и ТС клетках и сравнении количества нсДНК с окружающими участками, в качестве критерия ориджина были выбраны четырехкратный и двадцатикратный уровни обогащения для ТС и XEN клеток, соответственно.

В результате анализа паттерна нсДНК в локусе ХИС в ТС клетках было выявлено четыре активных ориджина 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 18 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 18 А, В). В фибробластах выявлен один наиболее активный ориджин репликации, расположенный в первом экзоне и в районе промотора гена *Xist* (сайты 6-12) (Рисунок 18 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). Однако эффективность данных ориджинов значительно ниже по сравнению с эффективностью ориджина в первом экзоне и в промоторе гена *Xist*, что говорит о том, что данные ориджины инициируют репликацию лишь в очень малом проценте клеток в культуре.

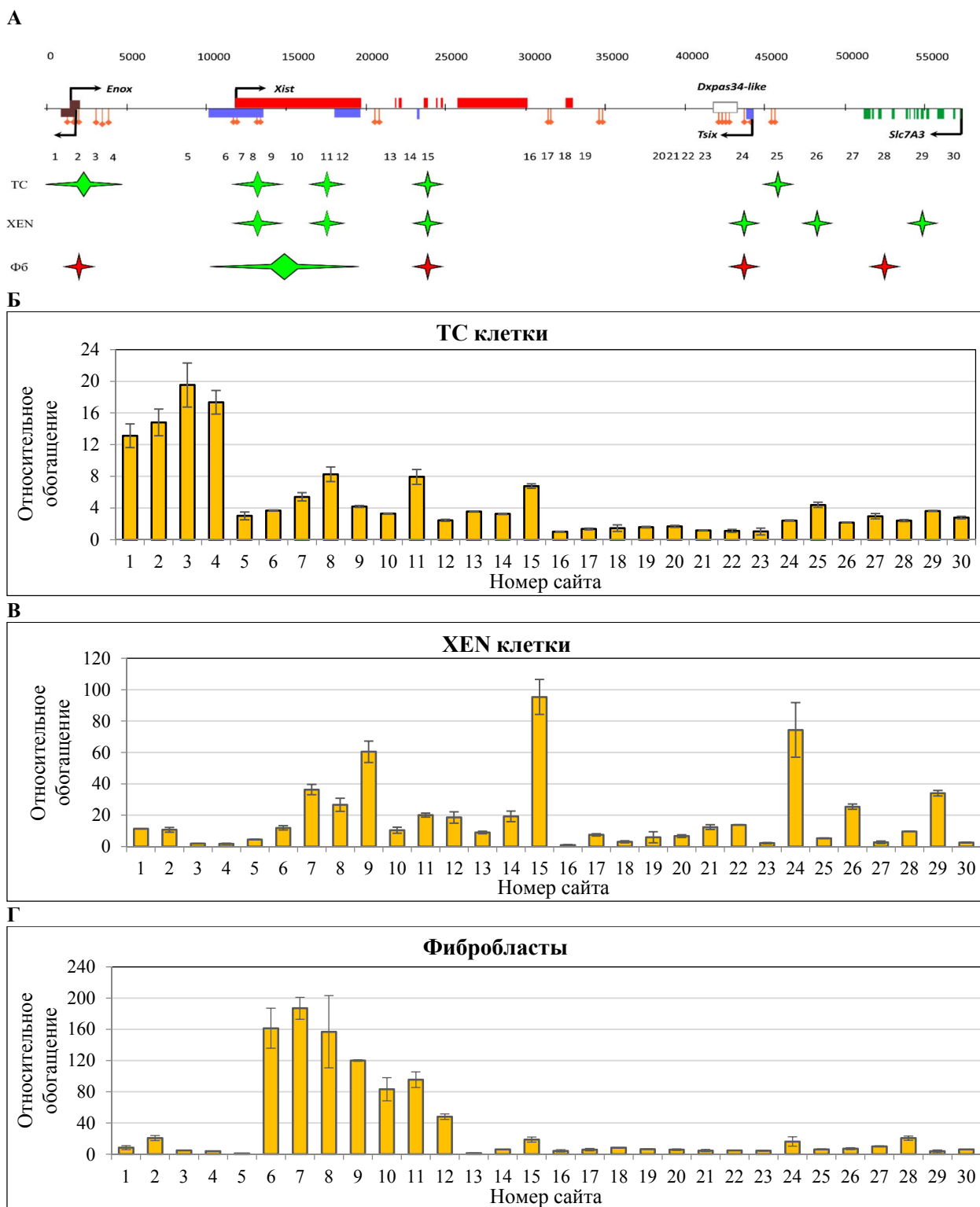


Рисунок 18. Картирование ориджин репликации методом NSAA в локусе XIC в ТС клетках, клетках ХЕН и в фибробластах самцов *M. levis*.

(А). Схема расположения ориджин 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 ориджин репликации обозначены зелеными звездочками, ориджин, показывающие низкую активность в фибробластах, – красными звездочками.

(Б-Г). Результаты количественного ПЦР анализа нсДНК длиной 750-1500 п.н. в ТС клетках (Б), клетках ХЕН (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.

Таким образом, инициация репликации в локусе XIC *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 XIC *M. levis* представляет собой зону инициации репликации, в составе которой можно выделить пять ориджин-ов репликации (Рисунок 19). Инициация репликации на протяженных участках была ранее показана в локусе *DHFR* китайского хомячка и в локусах *IgH* и β -глобина мыши, которые представляют собой зоны инициации репликации (Aladjem *et al.*, 2002; Dijkwel, Hamlin, 1995; Zhou *et al.*, 2002). В ряде полногеномных исследований было выявлено, что значительная часть ориджин-ов репликации в геноме человека организованы в зоны инициации репликации (Besnard *et al.*, 2012; Mesner *et al.*, 2013).

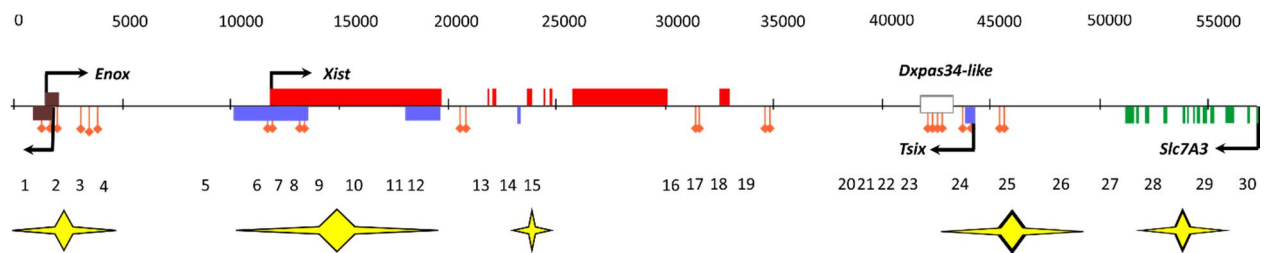


Рисунок 19. Расположение ориджин-ов репликации в локусе XIC *M. levis*. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, оранжевые точки – CGI. Цифрами внизу обозначено расположение пар праймеров, используемых в работе. Ориджин-ы репликации обозначены желтыми звездочками.

Ориджин-ы репликации в локусе XIC полевки были выделены на основе суммарных данных, полученных в трех типах клеток. При этом данные ориджин-ы репликации, за исключением расположенного в четвертом экзоне гена *Xist*, по-видимому, имеют множество точек инициации репликации. Большое количество точек инициации репликации в пределах одного ориджина ранее было показано для ориджина в районе промотора гена *DBF4* человека с помощью метода replication initiation point mapping (Romero, Lee, 2008). Данный ориджин состоит из двух зон, расположенных выше и ниже точки старта транскрипции гена *DBF4*, которые содержат множество точек инициации репликации. Можно предположить, что точка инициации репликации выбирается случайно с определенной вероятностью или эффективностью, как в пределах ориджина репликации, так и в пределах всего

локуса. Так как для картирования ориджинов использовали большое количество клеток, то данные паттерны инициации репликации суммарны для всех клеток в культуре. В отдельных клетках инициация репликации в локусе происходит, предположительно, на одной из всех выявленных точек инициации репликации. Данный механизм называется интерференция и показан для ряда других ориджинов репликации и зон инициации репликации у дрожжей *S. cerevisia* и человека методом молекулярного комбинга (Brewer, Fangman, 1993; Lebofsky *et al.*, 2006).

В ТС клетках и клетках XEN эффективность ориджинов в локусе XIC отличается незначительно. В то время как в фибробластах инициация репликации преимущественно происходит на ориджине в первом экзоне гена *Xist*. Таким образом, в фибробластах, вероятно, присутствуют факторы, значительно повышающие эффективность данного ориджина по сравнению с остальными, либо снижающие эффективность остальных ориджинов.

По одной из классификаций ориджины репликации можно разделить на конститутивные, которые активны вне зависимости от типа клеток, переменные, которые активны в только определенных типах клеток, и спящие, активирующиеся в условиях репликативного стресса, обусловленного, к примеру, недостатком нуклеозидтрифосфатов (Mechali, 2010). Ориджин в промоторе и первом экзоне гена *Xist* активен во всех исследованных нами типах клеток. Вероятно, данный ориджин конститутивен, причем паттерн инициации репликации на данном ориджине сходен в ТС клетках и клетках XEN, но отличается от такового в фибробластах.

Ранее было показано, что паттерн инициации репликации в локусе XIC мыши сходен в эмбриональных стволовых клетках и в фибробластах (Rowntree, Lee, 2006). В отличие от мыши, в локусе XIC полевки паттерн инициации репликации значительно различается в экстраэмбриональных стволовых клетках (ТС и XEN клетки) и фибробластах, что, по всей видимости, следствие изменения эффективности ориджинов. Изменения в эффективности ориджинов репликации в зависимости от типа клеток были продемонстрированы для ряда локусов в геномах мыши и курицы (Dazy *et al.*, 2006; Gregoire *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2009; Norio *et al.*, 2005). При полногеномном анализе ориджинов репликации в различных клетках человека было показано, что большинство ориджинов активны как в ЭС клетках так и в фибробластах, однако их эффективность отличается в зависимости от типа

клеток (Besnard *et al.*, 2012). Полученные при анализе паттерна инициации репликации в локусе ХИС полевки результаты согласуются с данной гипотезой, которая предполагает изменение в уровне эффективности отдельных ориджинов в зависимости от типа клеток.

Инициация репликации на некоторых ориджинах происходит в районах промоторов генов, однако, выявленные в локусе ХИС полевки ориджины преимущественно располагаются в телах генов. Отдельно стоит выделить ориджин репликации, ассоциированный с промотором гена *Tsix*. Инициация репликации на данном ориджине происходит как выше, так и ниже сайта старта транскрипции гена *Tsix* в зависимости от типа клеток. Такой паттерн инициации репликации характерен для значительной части ориджинов репликации мыши, расположенных в CGI-содержащих промоторах (Caugou *et al.*, 2011). При этом промотор гена *Tsix M. levis* также содержит CGI. Считается, что ориджины, расположенные в CGI-содержащих промоторах, характеризуются высокой эффективностью и конститутивны (Caugou *et al.*, 2011; Sequeira-Mendes *et al.*, 2009), однако, эффективность ориджина в промоторе гена *Tsix* в фибробластах полевки значительно ниже, чем у ориджина, расположенного в первом экзоне гена *Xist*.

Таким образом, локус ХИС *M. levis* представляет собой зону инициации репликации, содержащую пять ориджинов репликации, эффективность которых зависит от типа клеток.

3.1.2. 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*. Работоспособность антител для данной и последующих ChIP реакций проверяли

методами иммунофлуоресцентного окрашивания и вестерн блот-гибридизации (Рисунок 20). Работоспособность антител против H3K27me3 на полевке была проверена ранее в других исследованиях (Shevchenko *et al.*, 2009).

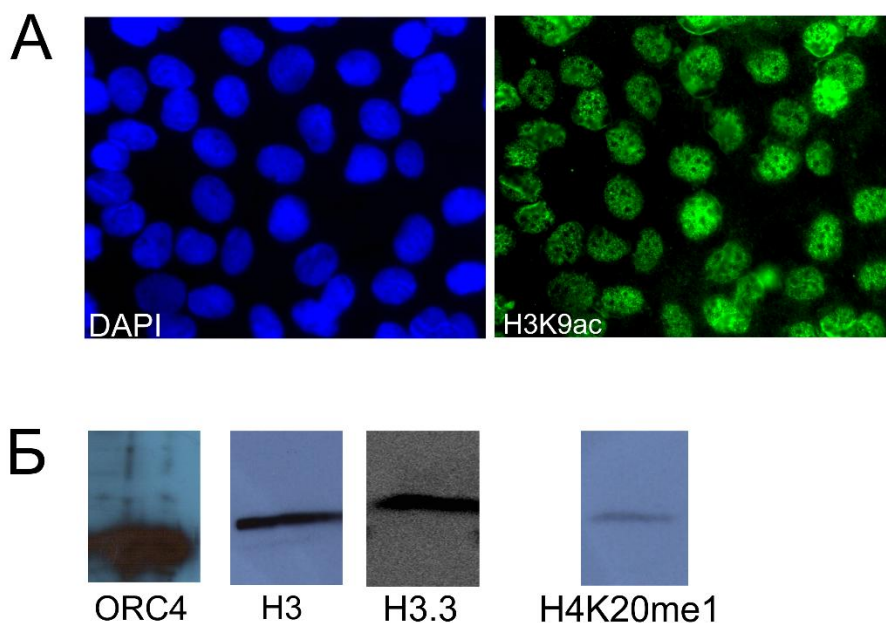


Рисунок 20. Проверка работоспособности антител, используемых для ChIP реакций.

(А). Иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов ядер фибробластов *M. levis* антителами к ацетилированному H3K9;

(Б). Вестерн блот-гибридизация с использованием экстрактов, полученных из фибробластов *M. levis*, антителами против ORC4 и гистонов H3, H3.3, H4K20me1.

Полученную в результате ChIP реакции с антителами против ORC4 ДНК амплифицировали с использованием набора GenomePlex[®] Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit. ChIP реакцию с антителами против ORC4 проводили в двух повторах. Амплификацию ДНК, которая была получена в результате каждой ChIP реакции, также осуществляли в двух повторах с использованием 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). Ряд сайтов не представлен в гистограмме, которая представляет результаты ChIP реакций с антителами против ORC4 в связи с тем, что данные сайты не показали значимого увеличения количества ДНК, связанного с ORC4, в предварительном анализе (сайты 5, 11, 12, 20, 21). 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 21).

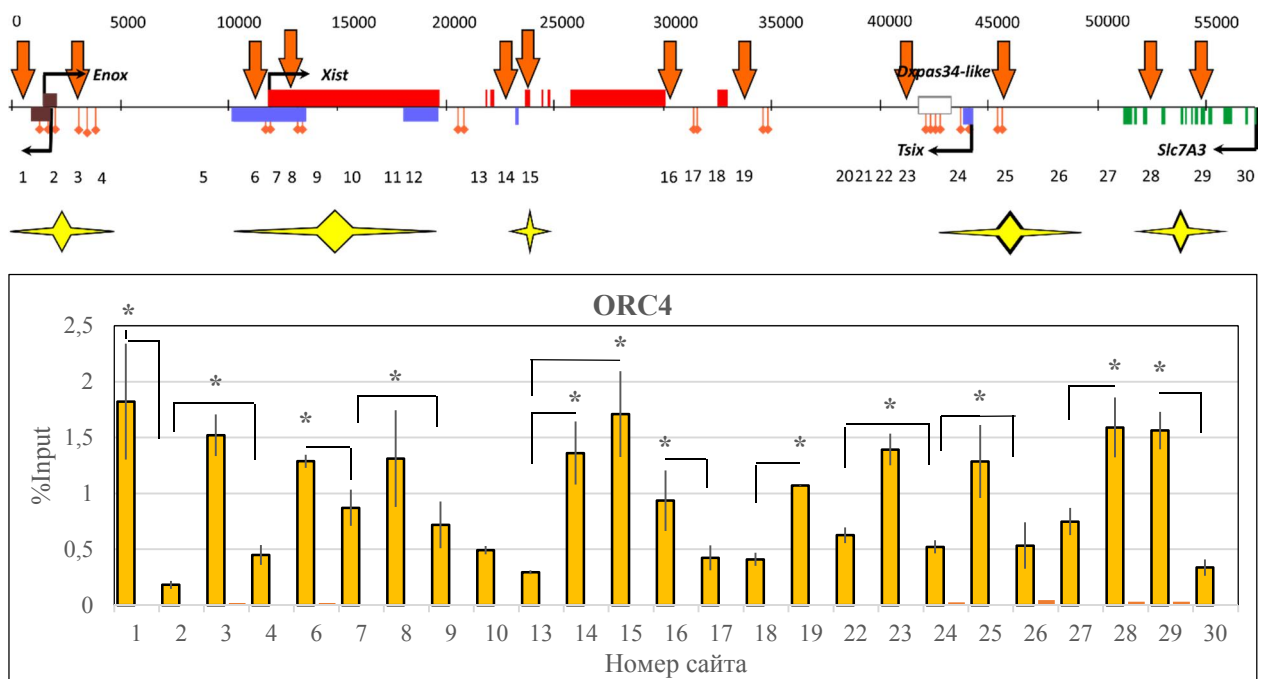


Рисунок 21. Локализация ORC в локусе XIC в фибробластах *M. levis*.

Вверху: Схема расположения сайтов связывания ORC в локусе XIC *M. levis*. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, оранжевые точки – CGI. Цифрами внизу обозначено расположение пар праймеров, используемых в работе. Оранжевые репликации обозначены желтыми звездочками, сайты связывания ORC – оранжевыми стрелками.

Внизу: 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).

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.

Стоит отметить, что на каждый ориджин репликации в локусе XIC *M. levis* в среднем приходится по два сайта связывания ORC. Предположительно, данные пары сайтов соответствуют связыванию как минимум двух ORC, так как расстояние между ними больше длины фрагментированного хроматина, который использовали для ChIP реакций. Данная ситуация не уникальна. Так ориджин репликации в промоторе гена *DBF4* человека содержит два сайта связывания ORC, расположенных на расстоянии около 800 п.н. (Romero, Lee, 2008). Районы вблизи сайтов связывания ORC, расположенных в 3' области гена *Xist* (сайты 16 и 19), не иницируют репликацию в TC клетках, клетках XEN и в фибробластах. Вероятно, данный район содержит один или несколько потенциальных ориджинов репликации, которые могут иницировать репликацию либо в других типах клеток, либо в случае репликативного стресса.

Связывание ORC также наблюдается в сайте 23, расположенного на расстоянии около 2 т.п.н. от ближайшего сайта, демонстрирующего инициацию репликации (сайт 24). Можно предположить, что либо данный район также может потенциально иницировать репликацию, либо связывание ORC в сайте 23 ответственно за инициацию репликации в районе промотора гена *Tsix*. Инициация репликации на некотором расстоянии от сайта связывания ORC ранее была продемонстрирована для ряда ориджинов у *D. melanogaster* и *S. pombe* (Austin *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 1999). Большое количество сайтов связывания ORC было также показано для зоны инициации репликации в локусе *DHFR* китайского хомячка (Lubelsky *et al.*, 2011). Стоит отметить, что сайт, демонстрирующий наиболее высокий уровень связывания ORC, не совпадает с наиболее предпочтительным сайтом инициации репликации. В ряде исследований было показано, что кроме инициации репликации ORC участвует в других процессах, таких как формирование гетерохроматина и связывание когезинов с ДНК (Pak *et al.*, 1997; Prasanth *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2004). Таким образом одним из возможных объяснений связывания

ORC в районах, которые не инициируют репликацию в локусе XIC, может быть участие ORC в данных процессах.

3.2. 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 локализируются в районах с повышенным содержанием АТ-нуклеотидов и присутствием poly(dA)-poly(dT) трактов (Aladjem, 2007; Altman, Fanning, 2004; Karnani *et al.*, 2011). В данной работе был проведен анализ последовательности ДНК в пределах от -500 до +500 п.н. от праймерных пар, которые демонстрируют связывание ORC. В результате, практически во всех районах связывания ORC не наблюдалось значительного изменения процентного содержания АТ и GC нуклеотидов по сравнению со всем локусом XIC *M. levis* (процент АТ-пар около 56). Исключения составляют сайты, расположенные 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. Из литературных источников известно, что данные тракты препятствуют формированию нуклеосом, что приводит к образованию свободных от нуклеосом районов длиной до 300 п.н. (Segal, Widom, 2009). В ряде работ показано, что ORC преимущественно связывается в районах с низкой нуклеосомной плотностью (Berbenetz *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 (Рисунок 22). В свою очередь 6 из 12 районов связывания ORC, расположены на расстоянии менее 600 п.н. от poly(dA)-poly(dT) трактов.

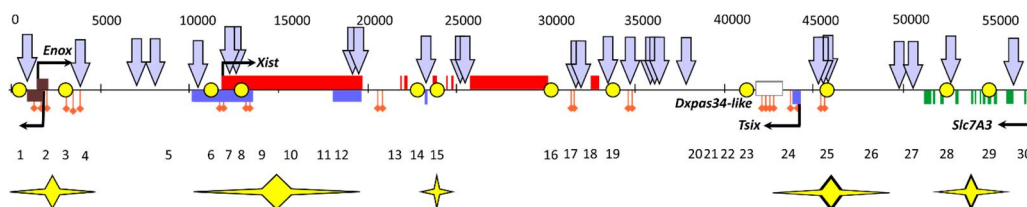


Рисунок 22. Расположение poly(dA)-poly(dT) трактов в локусе XIC *M. levis*.

Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, оранжевые точки – CGI. Цифрами внизу обозначено расположение пар праймеров, используемых в работе. Оранжевые репликации обозначены желтыми звездочками, сайты связывания ORC – желтыми кружками, poly(dA)-poly(dT) тракты – фиолетовыми стрелками.

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. Однако для того, чтобы установить влияние poly(dA)-poly(dT) трактов на связывание ORC требуется более точное картирование сайтов связывания ORC методами высокопроизводительного секвенирования, а также дополнительные исследования нуклеосомной плотности в данных районах и анализ связывания ORC в случае делеций poly(dA)-poly(dT) трактов.

3.3. 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; Cayrou *et al.*, 2012). Кроме того, в недавней работе было показано, что наличие G4 мотивов необходимо для

эффективной активации двух модельных ориджингов в геноме курицы (Valton *et al.*, 2014). Для того, чтобы выяснить наблюдается ли ассоциация ориджингов 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: $G_3N_{1-15}G_3N_{1-15}G_3N_{1-15}G_3$ (Besnard *et al.*, 2012; Cayrou *et al.*, 2012). В локусе XIC *M. levis* было выявлено 25 G4 мотивов, их последовательности и расположение в локусе приведены в Таблице 4 и на Рисунке 23.

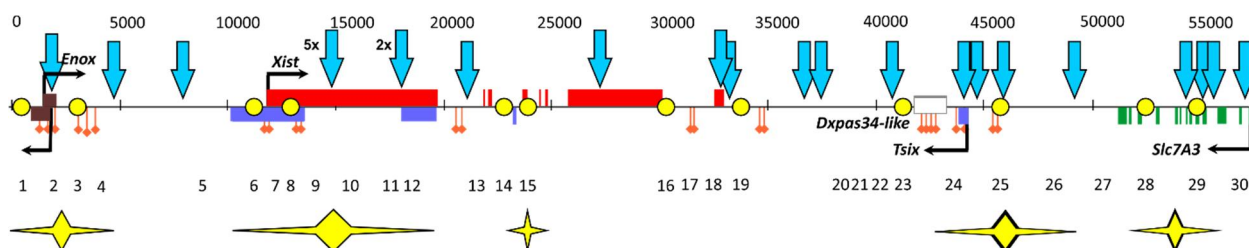


Рисунок 23. Расположение G4 мотивов в локусе XIC *M. levis*.

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, G4 мотивы – бирюзовыми стрелками. 5x и 2x – количество G4 мотивов, расположенных в близости друг от друга.

Таблица 4. Список G4 мотивов в локусе XIC *M. levis*.

№	Расположение в [AJ310130]	Длина	Последовательность G4 мотива	$G_3N_xG_3N_yG_3N_zG_3$
1	1912	40	GGGAGAAGAACGGGGTAGAAGGGAAACA AAAAGGAAAAAGGG	$G_3N_8G_3N_5G_3N_{15}G_3$
2	4398	27	GGGTCTGTGGCCGGGGGAAGGGAGGGG	$G_3N_9G_3N_4G_3N_2G_3$
3	7655	28	GGGGGGGGACGGGAACGTTGGATAAGGG	$G_3N_2G_3N_2G_3N_{12}G_3$
4	14603	24	GGGGGTCCGGGACGGGGATCGGGG	$G_3N_4G_3N_4G_3N_4G_3$
5	14629	33	GGGGTGGGTTGGGGTCCGGAAGCGGGG GGGGGG	$G_3N_7G_3N_{10}G_3N_4G_3$
6	14664	19	GGGTTGGGAACGGGACGGG	$G_3N_2G_3N_3G_3N_2G_3$
7	14686	21	GGGGTCCGGGTCGGGTCGGG	$G_3N_3G_3N_3G_3N_3G_3$
8	14726	30	GGGTCCGAGATTGGGGTCCGGGAAGGA GGG	$G_3N_9G_3N_4G_3N_5G_3$
9	18088	29	GGGAAAAGGGTCGAGGTAGTGGGACAGGG	$G_3N_4G_3N_{10}G_3N_3G_3$
10	18310	33	GGGTGAAACGTCGGGTACACAGGGTCT CGAGGG	$G_3N_9G_3N_6G_3N_6G_3$
11	21104	34	GGGTAGTGGGTGTGGGTCCGAACGGATCC GTGGG	$G_3N_4G_3N_3G_3N_{15}G_3$
12	27224	30	GGGAGGGTTAAAAATATGACGGGG GGGGGG	$G_3N_1G_3N_{13}G_3N_4G_3$
13	32844	39	GGGTGGGTGGATGGGTGGATGGATGGGTG GATGGGTGGG	$G_3N_9G_3N_9G_3N_9G_3$
14	33185	15	GGGGGGGGGGGGGGG	$G_3N_1G_3N_1G_3N_1G_3$

15	36753	32	GGGATGGAAAGTGGGGAAGAAGGGCA GTGGG	G ₃ N ₉ G ₃ N ₆ G ₃ N ₅ G ₃
16	37833	32	GGGATTGACTAGGGTAGGAGGGAAAT CAAGGG	G ₃ N ₈ G ₃ N ₅ G ₃ N ₇ G ₃
17	41052	27	GGGTGGGGGATGGGGTCTGGATGAGGG	G ₃ N ₃ G ₃ N ₃ G ₃ N ₉ G ₃
18	44118	24	GGGACCAGGGACCTGGGACCAGGG	G ₃ N ₄ G ₃ N ₄ G ₃ N ₄ G ₃
19	44492	26	GGGGTGGGTAAAGACGGGGACTGGGG	G ₃ N ₂ G ₃ N ₇ G ₃ N ₅ G ₃
20	45876	28	GGGCTCGGGGAAGTAAAGGGGATGCTGGG	G ₃ N ₄ G ₃ N ₆ G ₃ N ₆ G ₃
21	49056	26	GGGGAGAGGGAGAGAGGGAGAGAGGG	G ₃ N ₄ G ₃ N ₅ G ₃ N ₅ G ₃
22	54738	38	GGGTAAGACCTAAGGGAGAGGAGGGGGT ACTCCAGGG	G ₃ N ₁₀ G ₃ N ₈ G ₃ N ₈ G ₃
23	55114	35	GGGAAGGTCCGGGTCGGGGCGGGTAGT GAGTTGGG	G ₃ N ₇ G ₃ N ₇ G ₃ N ₉ G ₃
24	55797	28	GGGATGAGGTGGGGGGGGTAGCGTGGGG	G ₃ N ₇ G ₃ N ₂ G ₃ N ₇ G ₃
25	56957	15	GGGCGGGAGGGGGGG	G ₃ N ₁ G ₃ N ₁ G ₃ N ₁ G ₃

В результате анализа установлено, что в районах активных ориджинов репликации в локусе XIC *M. levis*, за исключением ориджина в четвертом экзоне гена *Xist*, выявляются G4 мотивы. Ориджин в четвертом экзоне гена *Xist* расположен на расстоянии около 2,5 т.п.н. от ближайшего G4 мотива. При этом в районе ориджина в первом экзоне гена *Xist*, который имеет высокую эффективность во всех исследованных типах клеток, выявляется наибольшее количество G4 мотивов (7) по сравнению с остальными ориджинами. При анализе ориджинотворения в геноме человека было показано, что чем выше плотность G4 мотивов в районе ориджина, тем выше его эффективность (Picard *et al.*, 2014). Однако, ориджин в первом экзоне гена *Xist* имеет наибольшую эффективность, по сравнению с другими ориджинами в локусе, только в фибробластах полевки. Большое количество G4 мотивов и районов, инициирующих репликацию, в локусе XIC *M. levis* может быть причиной того, что ассоциация ориджинотворения 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, что не превышает случайное количество. Данные результаты указывают на случайную ассоциацию G4 мотивов с ориджинами репликации в локусе XIC полевики. Ранее было показано, что ассоциация ориджинов, картированных методом bubble-trap, с G4 мотивами в геноме человека также случайна (Mesner *et al.*, 2013). Тем не менее для изучения ассоциации G4 мотивов с ориджинами репликации в геноме полевики требуются исследования на полногеномном уровне.

В работе по изучению связывания ORC человека с различными последовательностями ДНК и РНК *in vitro* было установлено, что ORC предпочтительнее связывается с РНК и одноцепочечными молекулами ДНК, содержащими G4 мотив (Hoshina *et al.*, 2013). При анализе расположения сайтов связывания ORC и G4 мотивов в локусе XIC *M. levis* установлено, что четыре сайта связывания ORC (19, 23, 25, 29) расположены в непосредственной близости от G4 мотивов, на расстоянии до 500 п.н. Остальные сайты связывания ORC расположены на расстоянии от 1000 до 3000 п.н. до ближайшего G4 мотива.

Таким образом, можно предположить, что в локусе XIC полевики ORC не связываются непосредственно с участками ДНК, содержащими G4 мотивы, однако G4 мотивы, вероятно, могут влиять на эффективность данных ориджинов репликации.

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

При анализе ориджинов репликации и транскриптома клеток человека был сделан вывод, что ориджины преимущественно ассоциированы с генами, транскрибируемыми 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). В другом исследовании при картировании сайтов связывания ORC в геноме человека было выявлено два класса ориджинов, которые ассоциированы с активно транскрибируемыми белок-кодирующими генами и генами длинных некодирующих РНК, транскрибируемыми на низком уровне (Dellino *et al.*, 2013). Относительно локуса XIC мыши было показано, что активность

ориджинов репликации в данном районе не зависит от активности ассоциированных с ними генов (Gomez, Brockdorff, 2004; Rowntree, Lee, 2006).

Ранее было показано, что 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 (Рисунок 24). Ориджины репликации в локусе XIC *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 XIC *M. levis* не зависит от транскрипционного статуса прилежащего хроматина.

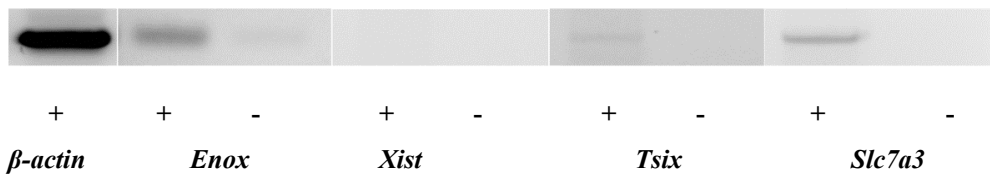


Рисунок 24. ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов *Enox*, *Xist*, *Tsix*, *Slc7a3* в фибробластах самцов *M. levis*.

(-) негативный контроль реакции обратной транскрипции.

3.5. Распределение гистона H3 и его варианта H3.3 в локусе XIC *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). Чтобы проверить зависит ли связывание ORC в локусе XIC *M. levis* от данных параметров и как они влияют на активность ориджинов репликации, был проведен анализ распределения гистона H3 и его варианта H3.3 в исследуемом локусе в фибробластах самцов *M. levis*. Анализ распределения гистона H3, его варианта H3.3, а также модификаций гистонов, проводили в фибробластах в связи с тем, что в данном типе клеток был обнаружен один высокоэффективный ориджин репликации.

Для анализа распределения гистона H3 и его варианта H3.3 было проведено два независимых эксперимента. В результате ПЦР анализа ChIP реакций с использованием антител против гистона H3 было установлено, что значимое снижение плотности гистона H3 наблюдается в первом экзоне гена *Xist* (сайт 10) (Рисунок 25). 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.

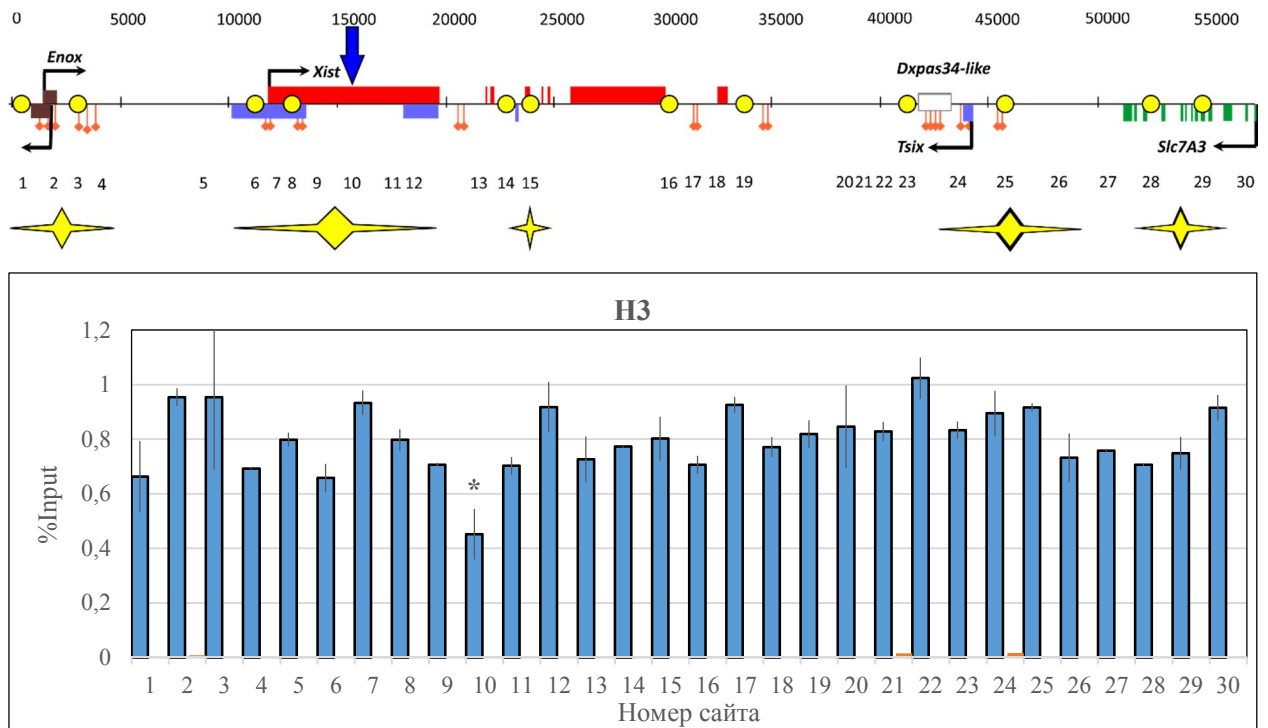


Рисунок 25. Паттерн распределения гистона H3 в локусе XIC в фибробластах *M. levis*.

Вверху: Схема расположения районов со сниженной плотностью гистона H3 в локусе XIC *M. levis*. 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, район со сниженной плотностью гистона H3 – синей стрелкой.

Внизу: 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. Звездочкой обозначена точка, демонстрирующая достоверное снижение плотности гистона H3 по сравнению со средним значением в локусе, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

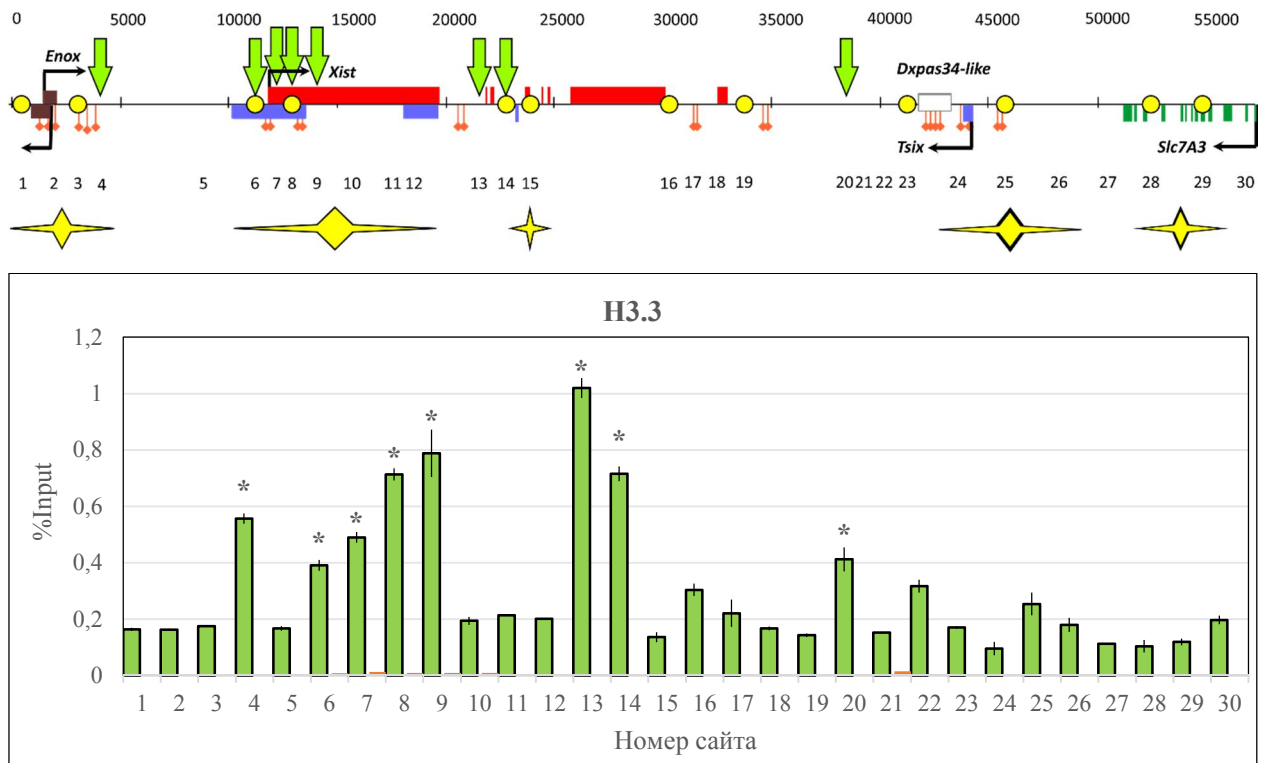


Рисунок 26. Паттерн распределения гистона H3.3 в локусе XIC в фибробластах *M. levis*.

Вверху: Схема расположения районов, содержащих гистон H3.3 в локусе XIC *M. levis*. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, оранжевые точки – CGI. Цифрами внизу обозначено расположение пар праймеров, используемых в работе. Оранжевые репликации обозначены желтыми звездочками, сайты связывания ORC – желтыми кружками, районы, содержащие гистон H3.3 – зелеными стрелками.

Внизу: 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).

При ПЦР анализе ChIP реакций с использованием антител против гистона H3.3 установлено, что данный вариант гистона H3 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 26).

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.

Первый экзон гена *Xist* мыши содержит участки со сниженной плотностью гистона H3 в трофобластных стволовых клетках (GSM967647). Ранее было показано, что первый экзон гена *Xist* мыши содержит конститутивный гиперчувствительный к ДНКазе I сайт (Tsai *et al.*, 2008). Вероятно, данный сайт консервативен, и первый экзон гена *Xist M. levis* также содержит участок, свободный от нуклеосом и гиперчувствительный к ДНКазе I, на что указывает низкая плотность гистона H3 в сайте 10. Вариант гистона H3.3 в эмбриональных фибробластах мыши наблюдается в районе промотора гена *Enox* и в районе, расположенном на расстоянии 3,5 т.п.н. выше сайта старта транскрипции гена *Tsix* (GSM1246678). Можно предположить, что сайт 4 в локусе ХИС полевки, расположенный вблизи гена *Enox* и демонстрирующий наличие H3.3, содержит регуляторный район данного гена. Однако ориджин репликации в данном районе в фибробластах полевки имеет низкую эффективность.

Низкая плотность нуклеосом и наличие варианта гистона H3.3 не представляют собой универсальную характеристику сайтов связывания ORC в локусе ХИС *M. levis*. Однако они, вероятно, в ряде случаев могут влиять на эффективность ориджинов репликации за счет создания открытой структуры хроматина в районах ориджинов.

3.6. Модификации хроматина в локусе ХИС в фибробластах самцов *M. levis*.

Паттерн ацетилирования H3K9, монометилирования H4K20 и триметилирования H3K27

Модификация N-концевых остатков гистонов – один из механизмов регуляции структуры хроматина, которая влияет на эффективность ориджинов репликации. В данной работе был проведен анализ паттерна ацетилирования H3K9, монометилирования H4K20 и триметилирования H3K27 в локусе ХИС 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). Считается, что ацетилирование гистонов стимулирует активацию ориджинов и может повышать их эффективность

(Burke *et al.*, 2001; Iizuka, Stillman, 1999; Iizuka *et al.*, 2006; Miotto, Struhl, 2008, 2010; Wong *et al.*, 2010).

Монометилирование H4K20, как было показано, участвует в регуляции лицензирования ориджинов репликации, кроме того для нескольких ориджинов в геноме человека показан повышенный уровень данной модификации (Tardat *et al.*, 2010). Однако, на сегодняшний день неизвестен уровень ассоциации ориджинов с данной модификацией и влияет ли она на эффективность ориджинов.

Триметилирование H3K27 участвует в репрессии генов и свойственно неактивному хроматину. В ряде работ было показано, что 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 триметилированным H3K27 (Picard *et al.*, 2014). ChIP реакции с антителами против H4K20me1 и H3K27me3 проводили в трех повторах, с антителами против H3K9ac – в двух. Достоверное увеличение уровня H3K9ac, H4K20me1 и H3K27me3 определяли в сравнении со средним значением в локусе с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера.

Ацетилирование H3K9 наблюдается в промоторе, первом экзоне и первом интроне гена *Xist* (сайты 6, 8-11, 13) (Рисунок 27). Таким образом, район наиболее эффективного ориджина в фибробластах самцов *M. levis* характеризуется присутствием гистона H3.3 и ацетилированием H3K9, причем максимальный уровень H3K9ac наблюдается в промоторе гена *Xist*. H3.3 и H3K9ac также маркируют первый интрон гена *Xist*, при этом данный район находится в относительной близости от ориджина репликации в четвертом экзоне гена *Xist*. Тем не менее, данный ориджин демонстрирует низкую эффективность в фибробластах самцов *M. levis*. Наличие маркеров активного хроматина в промоторе и первом экзоне гена *Xist* на активной X-хромосоме, по-видимому, отличительная черта локуса XIC полевки. У мыши в дифференцированных клетках в данном районе наблюдается триметилирование H3K9, которое поддерживает неактивное состояние гена *Xist* (Navarro *et al.*, 2009). Также, стоит отметить, что промотор гена *Enox* мыши в дифференцированных клетках обогащен H3K9ac. Однако у полевки в данном

районе не наблюдается значимого увеличения уровня данной модификации. Тем не менее о наличии в данном районе открытой структуры хроматина у полевки можно судить по присутствию варианта гистона H3.3.

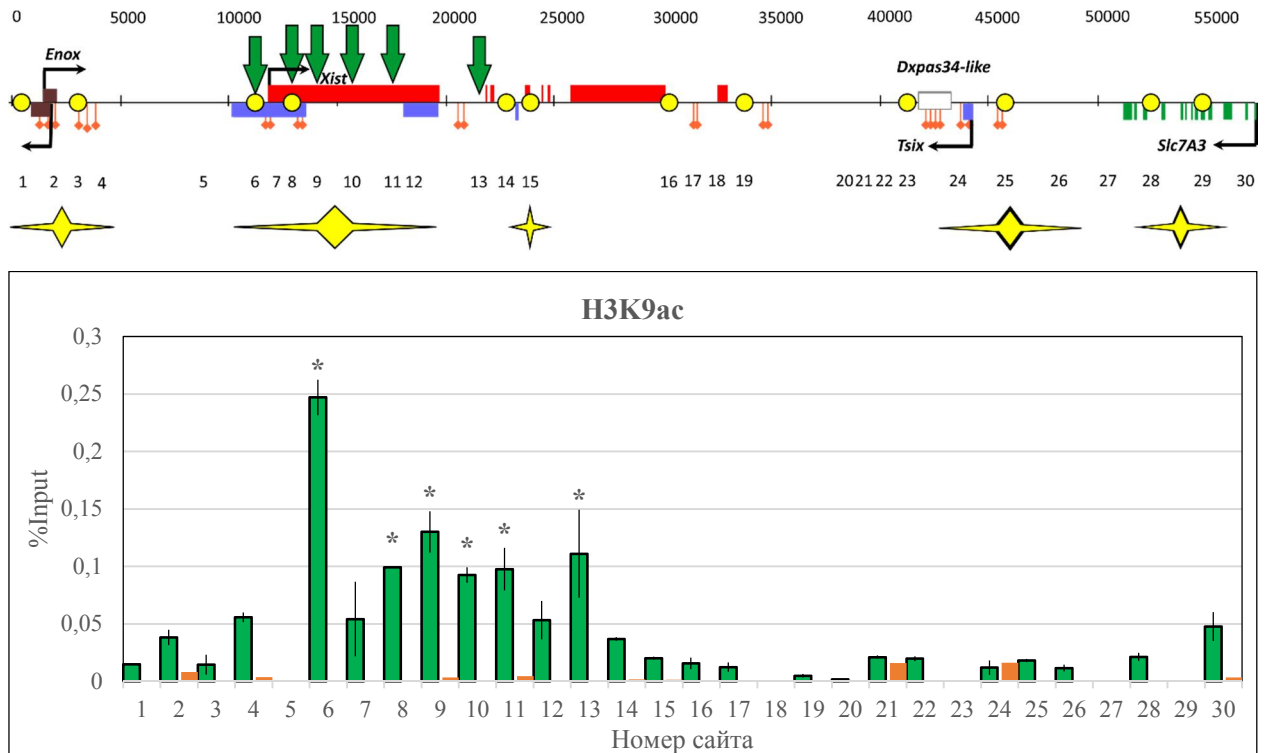


Рисунок 27. Паттерн ацетилирования H3K9 в локусе XIC в фибробластах *M. levis*.

Вверху: Схема расположения районов, содержащих ацетилированный H3K9 в локусе XIC *M. levis*. 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, районы, ацетилированные по H3K9 – зелеными стрелками.

Внизу: Результаты ПЦР анализа в реальном времени реакций ChIP с использованием антител против H3K9ас. 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 H3K9ас по сравнению со средним значением в локусе, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

Монометилирование H4K20 наблюдается во всем локусе XIC *M. levis* (Рисунок 28). 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). Причем минимальное значение наблюдается в сайте 10, что может быть следствием сниженной нуклеосомной плотности в данном районе. Кроме того, близкое к минимальному значение наблюдается в районе промотора гена *Xist*. Снижение уровня H4K20me1 в первом экзоне и промоторе гена *Xist* также свидетельствует об открытой структуре хроматина, на что указывает

присутствие варианта гистона H3.3 и H3K9ac. Предполагается, что H4K20me1 участвует в регуляции лицензирования ориджинов репликации (Tardat *et al.*, 2010). Таким образом, присутствие данной модификации гистонов в локусе XIC может обуславливать высокую плотность связывания ORC. Однако данная гипотеза требует дополнительных экспериментов для подтверждения.

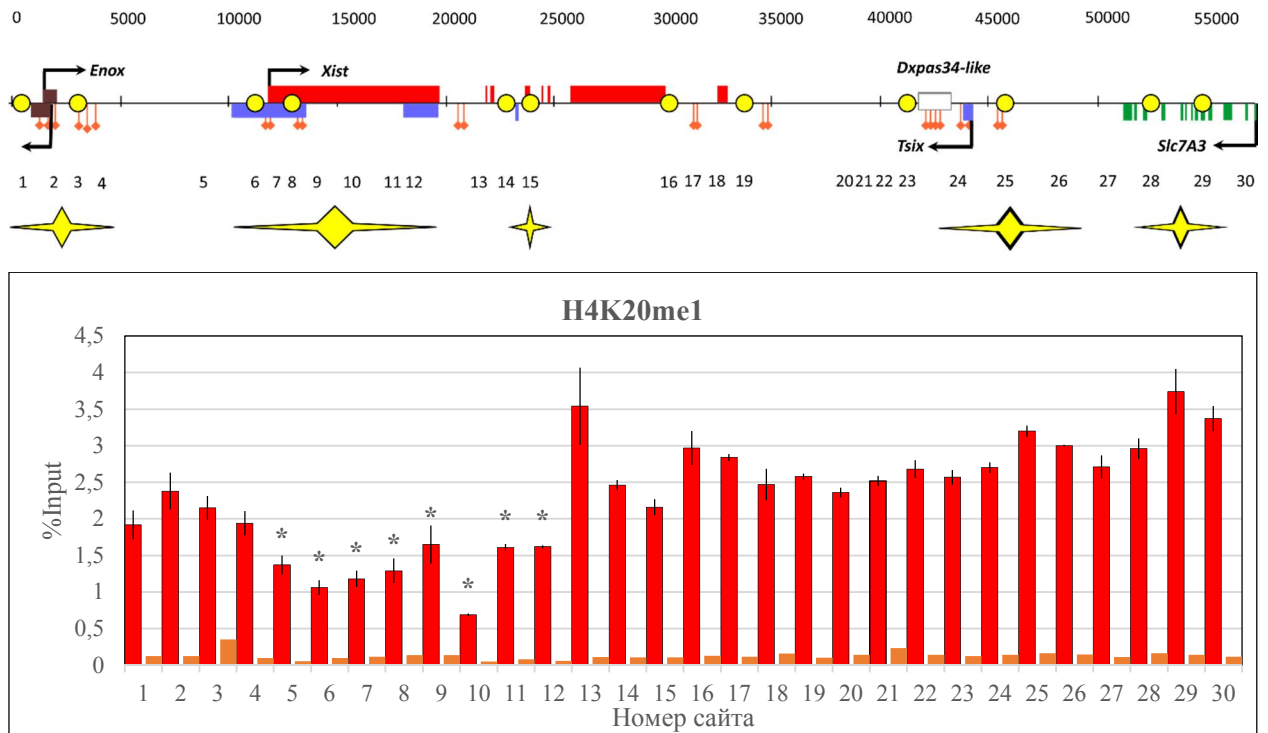


Рисунок 28. Паттерн монометилирования H4K20 в локусе XIC в фибробластах *M. levis*.

Вверху: Схема расположения районов, содержащих достоверное повышение уровня H4K20me1 в локусе XIC *M. levis*. 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: 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).

В результате анализа паттерна триметилирования H3K27 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 29). Наличие H3K27me3 и отсутствие H3.3 в 3' области первого экзона гена *Xist*, вероятно,

обуславливает снижение эффективности инициации репликации в данном районе по сравнению с промотором и 5' областью первого экзона гена *Xist* в фибробластах. Триметилирование H3K27 ассоциировано с неактивным в фибробластах *M. levis* ориджином, расположенном в промоторе гена *Tsix*, и частично перекрывается с активным ориджином репликации в первом экзоне гена *Xist*. На активной X-хромосоме в локусе ХИС мыши в районе промотора гена *Tsix* также выявляется H3K27me3. Данная модификация обеспечивает неактивное состояние гена *Tsix* в дифференцированных клетках мыши. Однако, несмотря на наличие H3K27me3 в промоторе гена *Tsix* полевки данный ген имеет активное состояние.

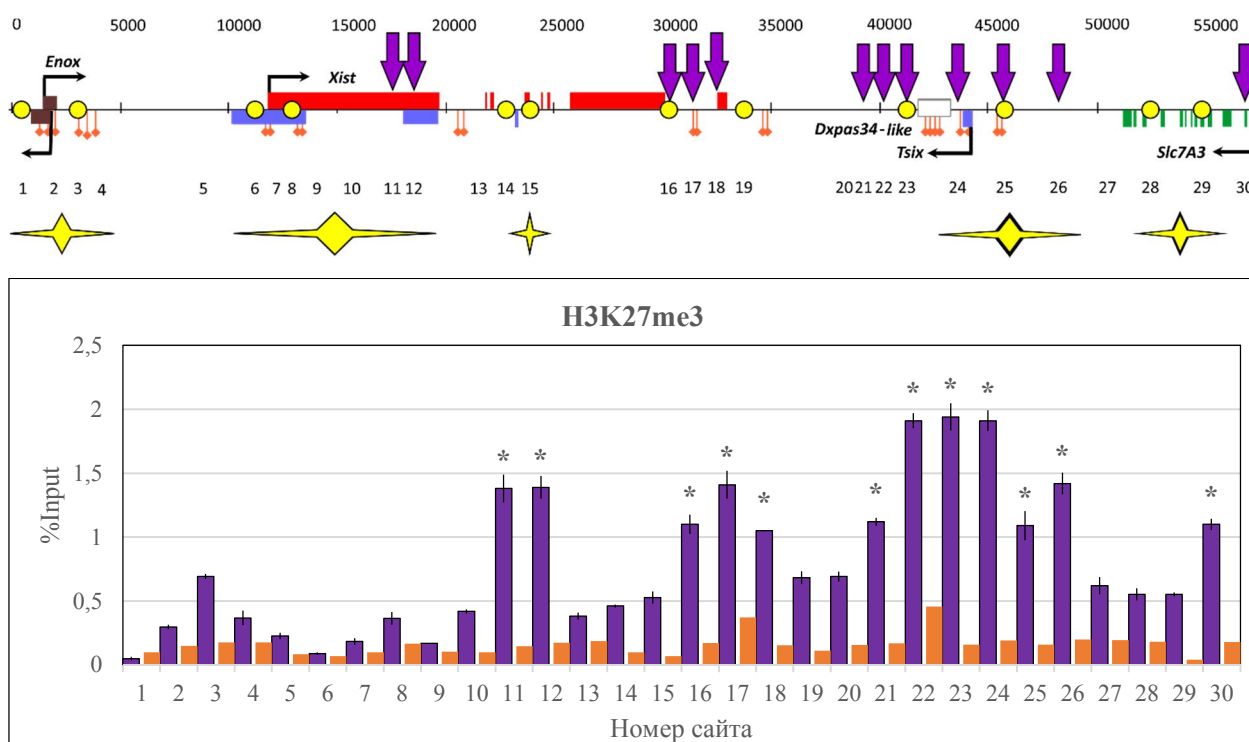


Рисунок 29. Паттерн триметилирования H3K27 в локусе ХИС в фибробластах *M. levis*.

Вверху: Схема расположения районов, содержащих достоверное повышение уровня H3K27me3 в локусе ХИС *M. levis*. 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, районы, содержащие достоверное повышение уровня H3K27me3 – фиолетовыми стрелками.

Внизу: 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 ориджина репликации и всех исследованных модификаций гистонов в локусе ХИС отображено на Рисунке 30. 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.

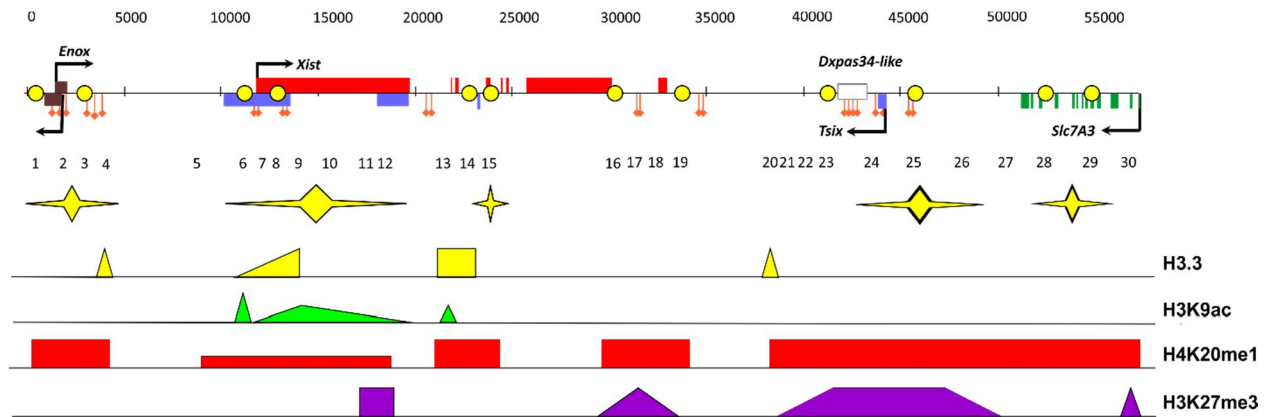


Рисунок 30. Схема расположения ориджина репликации, гистона H3.3 и исследованных модификаций гистонов в локусе ХИС *M. levis*.

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*.

Считается, что открытая структура хроматина может стимулировать активацию ориджина за счет более предпочтительного связывания белков, участвующих в процессе инициации репликации, тем самым повышая эффективность ориджина (Burke *et al.*, 2001; Iizuka, Stillman, 1999; Iizuka *et al.*, 2006; Miotto, Struhl, 2008, 2010; Wong *et al.*, 2010). Тем не менее, эффективные ориджины репликации также могут располагаться и в гипoaцетилированных районах (Crampton *et al.*, 2008; Hayashida *et al.*, 2006; Prioleau *et al.*, 2003). С другой стороны, наличие ацетилированных гистонов не гарантирует активацию ориджина в данном районе, как было показано на примере ориджина в локусе *HoxB* мыши (Gregoire *et al.*, 2006). Таким образом, можно предположить, что высокая эффективность ориджина в первом экзоне гена *Xist* может определяться не только открытой структурой хроматина, но и другими факторами, к примеру, высокой плотностью G4 мотивов, либо их совокупностью.

В районе промотора гена *Tsix* наблюдается триметилирование H3K27 и монометилирование H4K20, которые свойственны неактивному хроматину. В одном из полногеномных анализов ориджинов человека было показано, что CGI содержащие ориджины маркированные H4K20me1 или H3K27me3 характеризуются высокой эффективностью и протяженностью (Picard *et al.*, 2014). Однако, ориджины в промоторах генов *Tsix* и *Enox* в фибробластах полевки не характеризуются протяженным участком инициации репликации и имеют низкую эффективность. Можно предположить, что наличие обеих данных модификаций, и, как следствие, плотная упаковка хроматина, могут снижать эффективность ориджина в промоторе гена *Tsix* полевки. H4K20me1 также, вероятно, может снижать эффективность ориджинов. С другой стороны, присутствие H4K20me1 в всем локусе *Xist*, по-видимому, может свидетельствовать о возможном участии данной модификации в регуляции лицензирования ориджинов в локусе XIC *M. levis*, на что также указывает большое количество районов связывания ORC.

3.7. Сравнение расположения ориджинов репликации в локусах XIC *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 XIC *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 XIC мыши имеет значительное сходство с локусом XIC полевки (Nesterova *et al.*, 2001; Shevchenko *et al.*, 2011). Во многом схожа экзон-интронная структура гомологичных генов *Enox*, *Xist* и *Tsix* в локусах XIC полевки и мыши. Кроме того, наблюдается высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей кодирующих областей данных генов. Основное отличие данных локусов в том, что на расстоянии около 7 т.п.н. выше гена *Tsix* в XIC *M. levis* расположен ген *Slc7a3*, который был привнесен в данный локус в результате хромосомной перестройки и не входит в XIC

M. musculus (Shevchenko *et al.*, 2011). В отличие от полевки, в локусе ХИС мыши выше гена *Tsix* располагаются энхансер *Xite* и ген *Tsx*.

Также имеются различия в регуляции экспрессии генов в локусе ХИС у полевки и мыши. Так экспрессия гена *Xist* у мыши репрессируется за счет модификаций гистонов, характерных для неактивного хроматина. В то время как у полевки в области промотора гена *Xist* наблюдаются модификации активного хроматина: H3K9ac, а репрессия гена *Xist* осуществляется, по-видимому, за счет экспрессии гена *Tsix*, последний экзон которого перекрывает промотор гена *Xist*.

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 31). При этом сайты связывания ORC, расположенные в районе гена *Enox*, в промоторе гена *Xist* и в районе промотора гена *Tsix* выявляются как у мыши, так и у полевки.

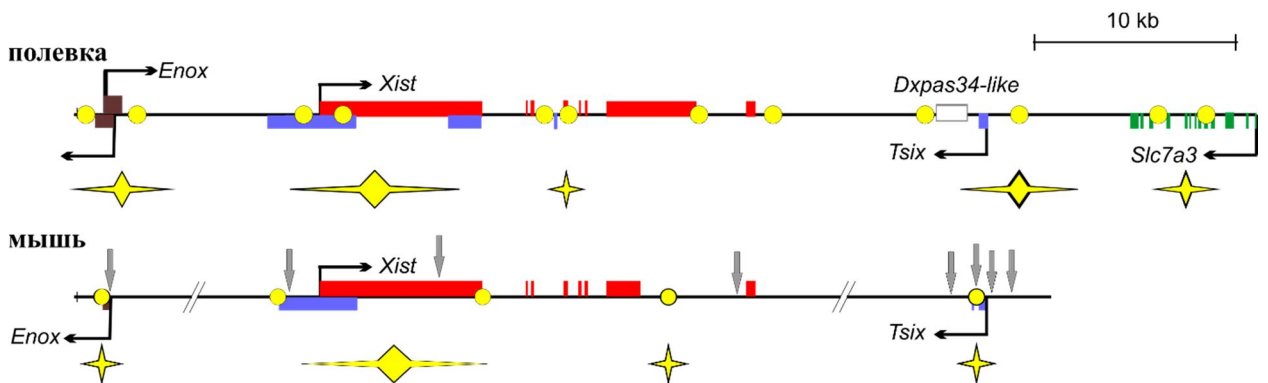


Рисунок 31. Сравнение расположения ориджинов репликации в локусах ХИС *M. levis* (вверху) и *M. musculus* (внизу).

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).

В локусе ХИС мыши все ориджины репликации ассоциированы с конститутивными гиперчувствительными к ДНКазе I сайтами (Gomez, Brockdorff, 2004; Rowntree, Lee, 2006; Tsai *et al.*, 2008). Ассоциация с сайтами, гиперчувствительными к ДНКазе I, показана для значительной части ориджинов человека (Cadoret *et al.*, 2008; Mesner *et al.*, 2013). Вероятно, в первом экзоне гена *Xist* полевки также присутствует гиперчувствительный к ДНКазе I сайт, на что указывает сниженная плотность гистона H3 в данном районе. Можно предположить,

что данный сайт и определяет расположение ориджина репликации в данном районе, а на его эффективность влияют другие факторы, например, модификации гистонов, в частности ацетилирование H3K9, которое, по-видимому, значительно повышает эффективность данного ориджина у *M. levis* по сравнению с остальными ориджинами в локусе. Напротив, у мыши в соматических клетках самцов в данном районе наблюдаются маркеры неактивного хроматина, вероятно, снижающие эффективность ориджина до уровня, сравнимого с остальными ориджинами в локусе, что приводит к их практически равновероятной активации в S фазе (Navarro *et al.*, 2009). Модификации неактивного хроматина, в частности H3K27me3, также выявляются в районе промотора гена *Tsix* мыши, который находится в неактивном состоянии на активной X-хромосоме мыши (Marks *et al.*, 2009). Несмотря на наличие данной модификации эффективность ориджина, расположенного в промоторе гена *Tsix* незначительно ниже эффективности остальных ориджинов в локусе XIC мыши (Gomez, Brockdorff, 2004; Rowntree, Lee, 2006).

Однако, в расположении и активности ориджинов репликации в локусе XIC полевки и мыши также 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 3' области 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 XIC *M. levis* и *M. musculus* выявляются как консервативные, так и варьируемые ориджины репликации, что может быть связано с механизмами регуляции генов в данном локусе, которые имеют как сходства, так и различия у данных видов млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

1. Abdurashidova G., Deganuto M., Klima R., Riva S., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A. Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin // *Science*. - 2000. - V. 287. - № 5460. - P. 2023-2026.
2. Adhikary S., Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins // *Nat Rev Mol Cell Biol*. - 2005. - V. 6. - № 8. - P. 635-645.
3. Aggarwal B.D., Calvi B.R. Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells // *Nature*. - 2004. - V. 430. - № 6997. - P. 372-376.
4. Aladjem M.I. Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans // *Nat Rev Genet*. - 2007. - V. 8. - № 8. - P. 588-600.
5. Aladjem M.I., Groudine M., Brody L.L., Dieken E.S., Fournier R.E., Wahl G.M., Epner E.M. Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication // *Science*. - 1995. - V. 270. - № 5237. - P. 815-819.
6. Aladjem M.I., Rodewald L.W., Lin C.M., Bowman S., Cimborra D.M., Brody L.L., Epner E.M., Groudine M., Wahl G.M. Replication initiation patterns in the beta-globin loci of totipotent and differentiated murine cells: evidence for multiple initiation regions // *Mol Cell Biol*. - 2002. - V. 22. - № 2. - P. 442-452.
7. Altman A.L., Fanning E. Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin // *Mol Cell Biol*. - 2004. - V. 24. - № 10. - P. 4138-4150.
8. Anglana M., Apiou F., Bensimon A., Debatisse M. Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing // *Cell*. - 2003. - V. 114. - № 3. - P. 385-394.
9. Aoto T., Saitoh N., Sakamoto Y., Watanabe S., Nakao M. Polycomb group protein-associated chromatin is reproduced in post-mitotic G1 phase and is required for S phase progression // *J Biol Chem*. - 2008. - V. 283. - № 27. - P. 18905-18915.
10. Aparicio T., Guillou E., Coloma J., Montoya G., Mendez J. The human GINS complex associates with Cdc45 and MCM and is essential for DNA replication // *Nucleic Acids Res*. - 2009. - V. 37. - № 7. - P. 2087-2095.
11. Araujo F.D., Knox J.D., Szyf M., Price G.B., Zannis-Hadjopoulos M. Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication // *Mol Cell Biol*. - 1998. - V. 18. - № 6. - P. 3475-3482.

12. Austin R.J., Orr-Weaver T.L., Bell S.P. *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element // *Genes Dev.* - 1999. - V. 13. - № 20. - P. 2639-2649.
13. Balestrini A., Cosentino C., Errico A., Garner E., Costanzo V. GEMC1 is a TopBP1-interacting protein required for chromosomal DNA replication // *Nat Cell Biol.* - 2010. - V. 12. - № 5. - P. 484-491.
14. Baral A., Kumar P., Pathak R., Chowdhury S. Emerging trends in G-quadruplex biology--role in epigenetic and evolutionary events // *Mol Biosyst.* - 2013. - V. 9. - № 7. - P. 1568-1575.
15. Beall E.L., Manak J.R., Zhou S., Bell M., Lipsick J.S., Botchan M.R. Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication // *Nature.* - 2002. - V. 420. - № 6917. - P. 833-837.
16. Beck D.B., Burton A., Oda H., Ziegler-Birling C., Torres-Padilla M.E., Reinberg D. The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h // *Genes Dev.* - 2012. - V. 26. - № 23. - P. 2580-2589.
17. Bell S.P., Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells // *Annu Rev Biochem.* - 2002. - V. 71. - P. 333-374.
18. Bensimon A., Simon A., Chiffaudel A., Croquette V., Heslot F., Bensimon D. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface // *Science.* - 1994. - V. 265. - № 5181. - P. 2096-2098.
19. Berbenetz N.M., Nislow C., Brown G.W. Diversity of eukaryotic DNA replication origins revealed by genome-wide analysis of chromatin structure // *PLoS Genet.* - 2010. - V. 6. - № 9. - P. e1001092
20. Berezney R., Dubey D.D., Huberman J.A. Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci // *Chromosoma.* - 2000. - V. 108. - № 8. - P. 471-484.
21. Berezney R., Mortillaro M.J., Ma H., Wei X., Samarabandu J. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function // *Int Rev Cytol.* - 1995. - V. 162A. - P. 1-65.
22. Besnard E., Babled A., Lapasset L., Milhavet O., Parrinello H., Dantec C., Marin J.M., Lemaitre J.M. Unraveling cell type-specific and reprogrammable human

- replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs // *Nat Struct Mol Biol.* - 2012. - V. 19. - № 8. - P. 837-844.
23. Bianco J.N., Poli J., Saksouk J., Bacal J., Silva M.J., Yoshida K., Lin Y.L., Tourriere H., Lengronne A., Pasero P. Analysis of DNA replication profiles in budding yeast and mammalian cells using DNA combing // *Methods.* - 2012. - V. 57. - № 2. - P. 149-157.
24. Bielinsky A.K., Blitzblau H., Beall E.L., Ezrokhi M., Smith H.S., Botchan M.R., Gerbi S.A. Origin recognition complex binding to a metazoan replication origin // *Curr Biol.* - 2001. - V. 11. - № 18. - P. 1427-1431.
25. Bielinsky A.K., Gerbi S.A. Chromosomal ARS1 has a single leading strand start site // *Mol Cell.* - 1999. - V. 3. - № 4. - P. 477-486.
26. Bielinsky A.K., Gerbi S.A. Discrete start sites for DNA synthesis in the yeast ARS1 origin // *Science.* - 1998. - V. 279. - № 5347. - P. 95-98.
27. Bochman M.L., Schwacha A. The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase // *Microbiol Mol Biol Rev.* - 2009. - V. 73. - № 4. - P. 652-683.
28. Breier A.M., Chatterji S., Cozzarelli N.R. Prediction of *Saccharomyces cerevisiae* replication origins // *Genome Biol.* - 2004. - V. 5. - № 4. - P. R22.
29. Brewer B.J., Fangman W.L. Initiation at closely spaced replication origins in a yeast chromosome // *Science.* - 1993. - V. 262. - № 5140. - P. 1728-1731.
30. Broach J.R., Li Y.Y., Feldman J., Jayaram M., Abraham J., Nasmyth K.A., Hicks J.B. Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* - 1983. - V. 47 Pt 2. - P. 1165-1173.
31. Brylawski B.P., Chastain P.D., 2nd, Cohen S.M., Cordeiro-Stone M., Kaufman D.G. Mapping of an origin of DNA replication in the promoter of fragile X gene FMR1 // *Exp Mol Pathol.* - 2007. - V. 82. - № 2. - P. 190-196.
32. Buongiorno-Nardelli M., Micheli G., Carri M.T., Marilley M. A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome // *Nature.* - 1982. - V. 298. - № 5869. - P. 100-102.
33. Burke T.W., Cook J.G., Asano M., Nevins J.R. Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1 // *J Biol Chem.* - 2001. - V. 276. - № 18. - P. 15397-15408.

34. Butler J.E., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression // *Genes Dev.* - 2002. - V. 16. - № 20. - P. 2583-2592.
35. Cadoret J.C., Meisch F., Hassan-Zadeh V., Luyten I., Guillet C., Duret L., Quesneville H., Prioleau M.N. Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008. - V. 105. - № 41. - P. 15837-15842.
36. Caro E., Castellano M.M., Gutierrez C. A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in *Arabidopsis* // *Nature.* - 2007. - V. 447. - № 7141. - P. 213-217.
37. Casas-Delucchi C.S., van Bemmelen J.G., Haase S., Herce H.D., Nowak D., Meilinger D., Stear J.H., Leonhardt H., Cardoso M.C. Histone hypoacetylation is required to maintain late replication timing of constitutive heterochromatin // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - V. 40. - № 1. - P. 159-169.
38. Cawley S., Bekiranov S., Ng H.H., Kapranov P., Sekinger E.A., Kampa D., Piccolboni A., Sementchenko V., Cheng J., Williams A.J., Wheeler R., Wong B., Drenkow J., Yamanaka M., Patel S., Brubaker S., Tammana H., Helt G., Struhl K., Gingeras T.R. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs // *Cell.* - 2004. - V. 116. - № 4. - P. 499-509.
39. Cayrou C., Coulombe P., Puy A., Rialle S., Kaplan N., Segal E., Mechali M. New insights into replication origin characteristics in metazoans // *Cell Cycle.* - 2012. - V. 11. - № 4. - P. 658-667.
40. Cayrou C., Coulombe P., Vigneron A., Stanojic S., Ganier O., Peiffer I., Rivals E., Puy A., Laurent-Chabalier S., Desprat R., Mechali M. Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features // *Genome Res.* - 2011. - V. 21. - № 9. - P. 1438-1449.
41. Chan T.F., Ha C., Phong A., Cai D., Wan E., Leung L., Kwok P.Y., Xiao M. A simple DNA stretching method for fluorescence imaging of single DNA molecules // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - V. 34. - № 17. - P. e113.

42. Chastain P.D., 2nd, Cohen S.M., Brylawski B.P., Cordeiro-Stone M., Kaufman D.G. A late origin of DNA replication in the trinucleotide repeat region of the human FMR2 gene // *Cell Cycle*. - 2006. - V. 5. - № 8. - P. 869-872.
43. Chowdhury A., Liu G., Kemp M., Chen X., Katrangi N., Myers S., Ghosh M., Yao J., Gao Y., Bubulya P., Leffak M. The DNA unwinding element binding protein DUE-B interacts with Cdc45 in preinitiation complex formation // *Mol Cell Biol*. - 2010. - V. 30. - № 6. - P. 1495-1507.
44. Chureau C., Prissette M., Bourdet A., Barbe V., Cattolico L., Jones L., Eggen A., Avner P., Duret L. Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine // *Genome Res*. - 2002. - V. 12. - № 6. - P. 894-908.
45. Cohen S.M., Brylawski B.P., Cordeiro-Stone M., Kaufman D.G. Same origins of DNA replication function on the active and inactive human X chromosomes // *J Cell Biochem*. - 2003. - V. 88. - № 5. - P. 923-931.
46. Collins N., Poot R.A., Kukimoto I., Garcia-Jimenez C., Dellaire G., Varga-Weisz P.D. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin // *Nat Genet*. - 2002. - V. 32. - № 4. - P. 627-632.
47. Comelli L., Marchetti L., Arosio D., Riva S., Abdurashidova G., Beltram F., Falaschi A. The homeotic protein HOXC13 is a member of human DNA replication complexes // *Cell Cycle*. - 2009. - V. 8. - № 3. - P. 454-459.
48. Conroy R.S., Koretsky A.P., Moreland J. Lambda exonuclease digestion of CGG trinucleotide repeats // *Eur Biophys J*. - 2010. - V. 39. - № 2. - P. 337-343.
49. Cook J.G., Chasse D.A., Nevins J.R. The regulated association of Cdt1 with minichromosome maintenance proteins and Cdc6 in mammalian cells // *J Biol Chem*. - 2004. - V. 279. - № 10. - P. 9625-9633.
50. Cossons N., Nielsen T.O., Dini C., Tomilin N., Young D.B., Riabowol K.T., Rattner J.B., Johnston R.N., Zannis-Hadjopoulos M., Price G.B. Circular YAC vectors containing a small mammalian origin sequence can associate with the nuclear matrix // *J Cell Biochem*. - 1997. - V. 67. - № 4. - P. 439-450.

51. Courbet S., Gay S., Arnoult N., Wronka G., Anglana M., Brison O., Debatisse M. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells // *Nature*. - 2008. - V. 455. - № 7212. - P. 557-560.
52. Crampton A., Chang F., Pappas D.L., Jr., Frisch R.L., Weinreich M. An ARS element inhibits DNA replication through a SIR2-dependent mechanism // *Mol Cell*. - 2008. - V. 30. - № 2. - P. 156-166.
53. Crevel G., Cotterill S. Forced binding of the origin of replication complex to chromosomal sites in *Drosophila* S2 cells creates an origin of replication // *J Cell Sci*. - 2012. - V. 125. - № Pt 4. - P. 965-972.
54. Czajkowsky D.M., Liu J., Hamlin J.L., Shao Z. DNA combing reveals intrinsic temporal disorder in the replication of yeast chromosome VI // *J Mol Biol*. - 2008. - V. 375. - № 1. - P. 12-19.
55. Danis E., Brodolin K., Menut S., Maiorano D., Girard-Reydet C., Mechali M. Specification of a DNA replication origin by a transcription complex // *Nat Cell Biol*. - 2004. - V. 6. - № 8. - P. 721-730.
56. Dazy S., Gandrillon O., Hyrien O., Prioleau M.N. Broadening of DNA replication origin usage during metazoan cell differentiation // *EMBO Rep*. - 2006. - V. 7. - № 8. - P. 806-811.
57. Deal R.B., Henikoff J.G., Henikoff S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones // *Science*. - 2010. - V. 328. - № 5982. - P. 1161-1164.
58. Del Bene F., Tessmar-Raible K., Wittbrodt J. Direct interaction of geminin and Six3 in eye development // *Nature*. - 2004. - V. 427. - № 6976. - P. 745-749.
59. Delgado S., Gomez M., Bird A., Antequera F. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes // *EMBO J*. - 1998. - V. 17. - № 8. - P. 2426-2435.
60. Dellino G.I., Cittaro D., Piccioni R., Luzi L., Banfi S., Segalla S., Cesaroni M., Mendoza-Maldonado R., Giacca M., Pelicci P.G. Genome-wide mapping of human DNA-replication origins: levels of transcription at ORC1 sites regulate origin selection and replication timing // *Genome Res*. - 2013. - V. 23. - № 1. - P. 1-11.
61. Dementyeva E.V., Shevchenko A.I., Anopriyenko O.V., Mazurok N.A., Elisaphenko E.A., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. Difference between

- random and imprinted X inactivation in common voles // *Chromosoma*. - 2010. - V. 119. - № 5. - P. 541-552.
62. DePamphilis M.L. Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? // *Bioessays*. - 1999. - V. 21. - № 1. - P. 5-16.
63. Diffley J.F. Eukaryotic DNA replication // *Curr Opin Cell Biol*. - 1994. - V. 6. - № 3. - P. 368-372.
64. Diffley J.F. Regulation of early events in chromosome replication // *Curr Biol*. - 2004. - V. 14. - № 18. - P. R778-786.
65. Diffley J.F., Labib K. The chromosome replication cycle // *J Cell Sci*. - 2002. - V. 115. - № Pt 5. - P. 869-872.
66. Dijkwel P.A., Hamlin J.L. Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells // *Mol Cell Biol*. - 1988. - V. 8. - № 12. - P. 5398-5409.
67. Dijkwel P.A., Hamlin J.L. Physical and genetic mapping of mammalian replication origins // *Methods*. - 1999. - V. 18. - № 3. - P. 418-431.
68. Dijkwel P.A., Hamlin J.L. The Chinese hamster dihydrofolate reductase origin consists of multiple potential nascent-strand start sites // *Mol Cell Biol*. - 1995. - V. 15. - № 6. - P. 3023-3031.
69. Dimitrova D.S., Giacca M., Demarchi F., Biamonti G., Riva S., Falaschi A. In vivo protein-DNA interactions at human DNA replication origin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1996. - V. 93. - № 4. - P. 1498-1503.
70. Dimitrova D.S., Gilbert D.M. The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase // *Mol Cell*. - 1999. - V. 4. - № 6. - P. 983-993.
71. Dimitrova D.S., Gilbert D.M. Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis // *Nat Cell Biol*. - 2000. - V. 2. - № 10. - P. 686-694.
72. Doksani Y., Bermejo R., Fiorani S., Haber J.E., Foiani M. Replicon dynamics, dormant origin firing, and terminal fork integrity after double-strand break formation // *Cell*. - 2009. - V. 137. - № 2. - P. 247-258.

73. Dominguez-Sola D., Ying C.Y., Grandori C., Ruggiero L., Chen B., Li M., Galloway D.A., Gu W., Gautier J., Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc // *Nature*. - 2007. - V. 448. - № 7152. - P. 445-451.
74. Eaton M.L., Galani K., Kang S., Bell S.P., MacAlpine D.M. Conserved nucleosome positioning defines replication origins // *Genes Dev*. - 2010. - V. 24. - № 8. - P. 748-753.
75. Eaton M.L., Prinz J.A., MacAlpine H.K., Tretyakov G., Kharchenko P.V., MacAlpine D.M. Chromatin signatures of the Drosophila replication program // *Genome Res*. - 2011. - V. 21. - № 2. - P. 164-174.
76. Eddy J., Maizels N. Selection for the G4 DNA motif at the 5' end of human genes // *Mol Carcinog*. - 2009. - V. 48. - № 4. - P. 319-325.
77. Edwards M.C., Tutter A.V., Cvetic C., Gilbert C.H., Prokhorova T.A., Walter J.C. MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts // *J Biol Chem*. - 2002. - V. 277. - № 36. - P. 33049-33057.
78. Farkash-Amar S., Lipson D., Polten A., Goren A., Helmstetter C., Yakhini Z., Simon I. Global organization of replication time zones of the mouse genome // *Genome Res*. - 2008. - V. 18. - № 10. - P. 1562-1570.
79. Flanagan J.F., Peterson C.L. A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication // *Nucleic Acids Res*. - 1999. - V. 27. - № 9. - P. 2022-2028.
80. Gao F., Zhang C.T. DoriC: a database of oriC regions in bacterial genomes // *Bioinformatics*. - 2007. - V. 23. - № 14. - P. 1866-1867.
81. Gerbi S.A. Mapping origins of DNA replication in eukaryotes // *Methods Mol Biol*. - 2005. - V. 296. - P. 167-180.
82. Gerbi S.A., Bielinsky A.K. Replication initiation point mapping // *Methods*. - 1997. - V. 13. - № 3. - P. 271-280.
83. Gerhardt J., Jafar S., Spindler M.P., Ott E., Schepers A. Identification of new human origins of DNA replication by an origin-trapping assay // *Mol Cell Biol*. - 2006. - V. 26. - № 20. - P. 7731-7746.
84. Gilbert D.M. Evaluating genome-scale approaches to eukaryotic DNA replication // *Nat Rev Genet*. - 2010. - V. 11. - № 10. - P. 673-684.

85. Gilbert D.M. Nuclear position leaves its mark on replication timing // *J Cell Biol.* - 2001. - V. 152. - № 2. - P. F11-15.
86. Gilbert D.M. Replication origins run (ultra) deep // *Nat Struct Mol Biol.* - 2012. - V. 19. - № 8. - P. 740-742.
87. Gilbert D.M., Takebayashi S.I., Ryba T., Lu J., Pope B.D., Wilson K.A., Hiratani I. Space and time in the nucleus: developmental control of replication timing and chromosome architecture // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* - 2010. - V. 75. - P. 143-153.
88. Gindin Y., Valenzuela M.S., Aladjem M.I., Meltzer P.S., Bilke S. A chromatin structure-based model accurately predicts DNA replication timing in human cells // *Mol Syst Biol.* - 2014. - V. 10. - P. 722.
89. Girard-Reydet C., Gregoire D., Vassetzky Y., Mechali M. DNA replication initiates at domains overlapping with nuclear matrix attachment regions in the xenopus and mouse c-myc promoter // *Gene.* - 2004. - V. 332. - P. 129-138.
90. Gomez M., Antequera F. Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome // *EMBO J.* - 1999. - V. 18. - № 20. - P. 5683-5690.
91. Gomez M., Brockdorff N. Heterochromatin on the inactive X chromosome delays replication timing without affecting origin usage // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2004. - V. 101. - № 18. - P. 6923-6928.
92. Goto Y., Gomez M., Brockdorff N., Feil R. Differential patterns of histone methylation and acetylation distinguish active and repressed alleles at X-linked genes // *Cytogenet Genome Res.* - 2002. - V. 99. - № 1-4. - P. 66-74.
93. Gregoire D., Brodolin K., Mechali M. HoxB domain induction silences DNA replication origins in the locus and specifies a single origin at its boundary // *EMBO Rep.* - 2006. - V. 7. - № 8. - P. 812-816.
94. Guan Z., Hughes C.M., Kosiyatrakul S., Norio P., Sen R., Fiering S., Allis C.D., Bouhassira E.E., Schildkraut C.L. Decreased replication origin activity in temporal transition regions // *J Cell Biol.* - 2009. - V. 187. - № 5. - P. 623-635.
95. Guenther M.G., Levine S.S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells // *Cell.* - 2007. - V. 130. - № 1. - P. 77-88.

96. Guilbaud G., Rappailles A., Baker A., Chen C.L., Arneodo A., Goldar A., d'Aubenton-Carafa Y., Thermes C., Audit B., Hyrien O. Evidence for sequential and increasing activation of replication origins along replication timing gradients in the human genome // *PLoS Comput Biol.* - 2011. - V. 7. - № 12. - P. e1002322.
97. Guillou E., Ibarra A., Coulon V., Casado-Vela J., Rico D., Casal I., Schwob E., Losada A., Mendez J. Cohesin organizes chromatin loops at DNA replication factories // *Genes Dev.* - 2010. - V. 24. - № 24. - P. 2812-2822.
98. Halder K., Halder R., Chowdhury S. Genome-wide analysis predicts DNA structural motifs as nucleosome exclusion signals // *Mol Biosyst.* - 2009. - V. 5. - № 12. - P. 1703-1712.
99. Halder R., Halder K., Sharma P., Garg G., Sengupta S., Chowdhury S. Guanine quadruplex DNA structure restricts methylation of CpG dinucleotides genome-wide // *Mol Biosyst.* - 2010. - V. 6. - № 12. - P. 2439-2447.
100. Hamlin J.L., Mesner L.D., Lar O., Torres R., Chodaparambil S.V., Wang L. A revisionist replicon model for higher eukaryotic genomes // *J Cell Biochem.* - 2008. - V. 105. - № 2. - P. 321-329.
101. Hansen R.S., Thomas S., Sandstrom R., Canfield T.K., Thurman R.E., Weaver M., Dorschner M.O., Gartler S.M., Stamatoyannopoulos J.A. Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2010. - V. 107. - № 1. - P. 139-144.
102. Hayashi M.T., Takahashi T.S., Nakagawa T., Nakayama J., Masukata H. The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus // *Nat Cell Biol.* - 2009. - V. 11. - № 3. - P. 357-362.
103. Hayashida T., Oda M., Ohsawa K., Yamaguchi A., Hosozawa T., Locksley R.M., Giacca M., Masai H., Miyatake S. Replication initiation from a novel origin identified in the Th2 cytokine cluster locus requires a distant conserved noncoding sequence // *J Immunol.* - 2006. - V. 176. - № 9. - P. 5446-5454.
104. Heichinger C., Penkett C.J., Bahler J., Nurse P. Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins // *EMBO J.* - 2006. - V. 25. - № 21. - P. 5171-5179.

105. Hendricks S.P., Mathews C.K. Differential effects of hydroxyurea upon deoxyribonucleoside triphosphate pools, analyzed with vaccinia virus ribonucleotide reductase // *J Biol Chem.* - 1998. - V. 273. - № 45. - P. 29519-29523.
106. Hiratani I., Gilbert D.M. Replication timing as an epigenetic mark // *Epigenetics.* - 2009. - V. 4. - № 2. - P. 93-97.
107. Hiratani I., Ryba T., Itoh M., Rathjen J., Kulik M., Papp B., Fussner E., Bazett-Jones D.P., Plath K., Dalton S., Rathjen P.D., Gilbert D.M. Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis // *Genome Res.* - 2010. - V. 20. - № 2. - P. 155-169.
108. Hiratani I., Ryba T., Itoh M., Yokochi T., Schwaiger M., Chang C.W., Lyou Y., Townes T.M., Schubeler D., Gilbert D.M. Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation // *PLoS Biol.* - 2008. - V. 6. - № 10. - P. e245.
109. Hizume K., Yagura M., Araki H. Concerted interaction between origin recognition complex (ORC), nucleosomes and replication origin DNA ensures stable ORC-origin binding // *Genes Cells.* - 2013. - V. 18. - № 9. - P. 764-779.
110. Hoshina S., Yura K., Teranishi H., Kiyasu N., Tominaga A., Kadoma H., Nakatsuka A., Kunichika T., Obuse C., Waga S. Human origin recognition complex binds preferentially to G-quadruplex-preferable RNA and single-stranded DNA // *J Biol Chem.* - 2013. - V. 288. - № 42. - P. 30161-30171.
111. Huberman J.A., Riggs A.D. Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1966. - V. 55. - № 3. - P. 599-606.
112. Huppert J.L., Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - V. 33. - № 9. - P. 2908-2916.
113. Hyrien O., Maric C., Mechali M. Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins // *Science.* - 1995. - V. 270. - № 5238. - P. 994-997.
114. Iarovaia O.V., Bystritskiy A., Ravcheev D., Hancock R., Razin S.V. Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - V. 32. - № 7. - P. 2079-2086.

115. Ibarra A., Schwob E., Mendez J. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008. - V. 105. - № 26. - P. 8956-8961.
116. Iizuka M., Matsui T., Takisawa H., Smith M.M. Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1 // *Mol Cell Biol.* - 2006. - V. 26. - № 3. - P. 1098-1108.
117. Iizuka M., Stillman B. Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein // *J Biol Chem.* - 1999. - V. 274. - № 33. - P. 23027-23034.
118. Iizuka M., Takahashi Y., Mizzen C.A., Cook R.G., Fujita M., Allis C.D., Frierson H.F., Jr., Fukusato T., Smith M.M. Histone acetyltransferase Hbo1: catalytic activity, cellular abundance, and links to primary cancers // *Gene.* - 2009. - V. 436. - № 1-2. - P. 108-114.
119. Im J.S., Ki S.H., Farina A., Jung D.S., Hurwitz J., Lee J.K. Assembly of the Cdc45-Mcm2-7-GINS complex in human cells requires the Ctf4/And-1, RecQL4, and Mcm10 proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - V. 106. - № 37. - P. 15628-15632.
120. Jenke A.C., Stehle I.M., Herrmann F., Eisenberger T., Baiker A., Bode J., Fackelmayer F.O., Lipps H.J. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2004. - V. 101. - № 31. - P. 11322-11327.
121. Jeon Y., Lee K.Y., Ko M.J., Lee Y.S., Kang S., Hwang D.S. Human TopBP1 participates in cyclin E/CDK2 activation and preinitiation complex assembly during G1/S transition // *J Biol Chem.* - 2007. - V. 282. - № 20. - P. 14882-14890.
122. Johansson E., Macneill S.A. The eukaryotic replicative DNA polymerases take shape // *Trends Biochem Sci.* - 2010. - V. 35. - № 6. - P. 339-347.
123. Johnston C.M., Newall A.E., Brockdorff N., Nesterova T.B. Enox, a novel gene that maps 10 kb upstream of Xist and partially escapes X inactivation // *Genomics.* - 2002. - V. 80. - № 2. - P. 236-244.
124. Kamath S., Leffak M. Multiple sites of replication initiation in the human beta-globin gene locus // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - V. 29. - № 3. - P. 809-817.

125. Kanemaki M., Labib K. Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks // *EMBO J.* - 2006. - V. 25. - № 8. - P. 1753-1763.
126. Kang Y.H., Farina A., Bermudez V.P., Tappin I., Du F., Galal W.C., Hurwitz J. Interaction between human Ctf4 and the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) replicative helicase // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2013. - V. 110. - № 49. - P. 19760-19765.
127. Karnani N., Taylor C.M., Malhotra A., Dutta A. Genomic study of replication initiation in human chromosomes reveals the influence of transcription regulation and chromatin structure on origin selection // *Mol Biol Cell.* - 2010. - V. 21. - № 3. - P. 393-404.
128. Katsuno Y., Suzuki A., Sugimura K., Okumura K., Zineldeen D.H., Shimada M., Niida H., Mizuno T., Hanaoka F., Nakanishi M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - V. 106. - № 9. - P. 3184-3189.
129. Keaton M.A., Taylor C.M., Layer R.M., Dutta A. Nuclear scaffold attachment sites within ENCODE regions associate with actively transcribed genes // *PLoS One.* - 2011. - V. 6. - № 3. - P. e17912.
130. Keller C., Ladenburger E.M., Kremer M., Knippers R. The origin recognition complex marks a replication origin in the human TOP1 gene promoter // *J Biol Chem.* - 2002. - V. 277. - № 35. - P. 31430-31440.
131. Kikin O., D'Antonio L., Bagga P.S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - V. 34. - № Web Server issue. - P. W676-682.
132. Knott S.R., Peace J.M., Ostrow A.Z., Gan Y., Rex A.E., Viggiani C.J., Tavare S., Aparicio O.M. Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae* // *Cell.* - 2012. - V. 148. - № 1-2. - P. 99-111.
133. Krasinska L., Besnard E., Cot E., Dohet C., Mechali M., Lemaitre J.M., Fisher D. Cdk1 and Cdk2 activity levels determine the efficiency of replication origin firing in *Xenopus* // *EMBO J.* - 2008. - V. 27. - № 5. - P. 758-769.

134. Kreitz S., Ritzi M., Baack M., Knippers R. The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells // *J Biol Chem.* - 2001. - V. 276. - № 9. - P. 6337-6342.
135. Kubota Y., Takase Y., Komori Y., Hashimoto Y., Arata T., Kamimura Y., Araki H., Takisawa H. A novel ring-like complex of *Xenopus* proteins essential for the initiation of DNA replication // *Genes Dev.* - 2003. - V. 17. - № 9. - P. 1141-1152.
136. Kumagai A., Shevchenko A., Shevchenko A., Dunphy W.G. Treslin collaborates with TopBP1 in triggering the initiation of DNA replication // *Cell.* - 2010. - V. 140. - № 3. - P. 349-359.
137. Kuo A.J., Song J., Cheung P., Ishibe-Murakami S., Yamazoe S., Chen J.K., Patel D.J., Gozani O. The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome // *Nature.* - 2012. - V. 484. - № 7392. - P. 115-119.
138. Labib K. How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? // *Genes Dev.* - 2010. - V. 24. - № 12. - P. 1208-1219.
139. Lagarkova M.A., Svetlova E., Giacca M., Falaschi A., Razin S.V. DNA loop anchorage region colocalizes with the replication origin located downstream to the human gene encoding lamin B2 // *J Cell Biochem.* - 1998. - V. 69. - № 1. - P. 13-18.
140. Lande-Diner L., Zhang J., Cedar H. Shifts in replication timing actively affect histone acetylation during nucleosome reassembly // *Mol Cell.* - 2009. - V. 34. - № 6. - P. 767-774.
141. Landolin J.M., Johnson D.S., Trinklein N.D., Aldred S.F., Medina C., Shulha H., Weng Z., Myers R.M. Sequence features that drive human promoter function and tissue specificity // *Genome Res.* - 2010. - V. 20. - № 7. - P. 890-898.
142. Larsen A.K., Skladanowski A., Bojanowski K. The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle // *Prog Cell Cycle Res.* - 1996. - V. 2. - P. 229-239.

143. Lawlis S.J., Keezer S.M., Wu J.R., Gilbert D.M. Chromosome architecture can dictate site-specific initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts // *J Cell Biol.* - 1996. - V. 135. - № 5. - P. 1207-1218.
144. Lebofsky R., Bensimon A. Single DNA molecule analysis: applications of molecular combing // *Brief Funct Genomic Proteomic.* - 2003. - V. 1. - № 4. - P. 385-396.
145. Lebofsky R., Heilig R., Sonnleitner M., Weissenbach J., Bensimon A. DNA replication origin interference increases the spacing between initiation events in human cells // *Mol Biol Cell.* - 2006. - V. 17. - № 12. - P. 5337-5345.
146. Lee J.T., Davidow L.S., Warshawsky D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre // *Nat Genet.* - 1999. - V. 21. - № 4. - P. 400-404.
147. Lee K.Y., Bang S.W., Yoon S.W., Lee S.H., Yoon J.B., Hwang D.S. Phosphorylation of ORC2 protein dissociates origin recognition complex from chromatin and replication origins // *J Biol Chem.* - 2012. - V. 287. - № 15. - P. 11891-11898.
148. Lee T.I., Johnstone S.E., Young R.A. Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location // *Nat Protoc.* - 2006. - V. 1. - № 2. - P. 729-748.
149. Lemaitre J.M., Danis E., Pasero P., Vassetzky Y., Mechali M. Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure // *Cell.* - 2005. - V. 123. - № 5. - P. 787-801.
150. Liachko I., Youngblood R.A., Tsui K., Bubb K.L., Queitsch C., Raghuraman M.K., Nislow C., Brewer B.J., Dunham M.J. GC-rich DNA elements enable replication origin activity in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *PLoS Genet.* - 2014. - V. 10. - № 3. - P. e1004169.
151. Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragozy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // *Science.* - 2009. - V. 326. - № 5950. - P. 289-293.

152. Lipford J.R., Bell S.P. Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication // *Mol Cell*. - 2001. - V. 7. - № 1. - P. 21-30.
153. Liu G., Malott M., Leffak M. Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator // *Mol Cell Biol*. - 2003. - V. 23. - № 5. - P. 1832-1842.
154. Lo Sardo F., Lanzuolo C., Comoglio F., De Bardi M., Paro R., Orlando V. PcG-mediated higher-order chromatin structures modulate replication programs at the *Drosophila* BX-C // *PLoS Genet*. - 2013. - V. 9. - № 2. - P. e1003283.
155. Lombrana R., Almeida R., Revuelta I., Madeira S., Herranz G., Saiz N., Bastolla U., Gomez M. High-resolution analysis of DNA synthesis start sites and nucleosome architecture at efficient mammalian replication origins // *EMBO J*. - 2013. - V. 32. - № 19. - P. 2631-2644.
156. Lu J., Li F., Murphy C.S., Davidson M.W., Gilbert D.M. G2 phase chromatin lacks determinants of replication timing // *J Cell Biol*. - 2010. - V. 189. - № 6. - P. 967-980.
157. Lubelsky Y., MacAlpine H.K., MacAlpine D.M. Genome-wide localization of replication factors // *Methods*. - 2012. - V. 57. - № 2. - P. 187-195.
158. Lubelsky Y., Sasaki T., Kuipers M.A., Lucas I., Le Beau M.M., Carignon S., Debatisse M., Prinz J.A., Dennis J.H., Gilbert D.M. Pre-replication complex proteins assemble at regions of low nucleosome occupancy within the Chinese hamster dihydrofolate reductase initiation zone // *Nucleic Acids Res*. - 2011. - V. 39. - № 8. - P. 3141-3155.
159. Lucas I., Palakodeti A., Jiang Y., Young D.J., Jiang N., Fernald A.A., Le Beau M.M. High-throughput mapping of origins of replication in human cells // *EMBO Rep*. - 2007. - V. 8. - № 8. - P. 770-777.
160. Luikenhuis S., Wutz A., Jaenisch R. Antisense transcription through the Xist locus mediates Tsix function in embryonic stem cells // *Mol Cell Biol*. - 2001. - V. 21. - № 24. - P. 8512-8520.
161. Lunyak V.V., Ezrokhi M., Smith H.S., Gerbi S.A. Developmental changes in the *Sciara* II/9A initiation zone for DNA replication // *Mol Cell Biol*. - 2002. - V. 22. - № 24. - P. 8426-8437.

162. Luo L., Yang X., Takihara Y., Knoetgen H., Kessel M. The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions // *Nature*. - 2004. - V. 427. - № 6976. - P. 749-753.
163. Lutzmann M., Maiorano D., Mechali M. A Cdt1-geminin complex licenses chromatin for DNA replication and prevents rereplication during S phase in *Xenopus* // *EMBO J*. - 2006. - V. 25. - № 24. - P. 5764-5774.
164. Lutzmann M., Maiorano D., Mechali M. Identification of full genes and proteins of MCM9, a novel, vertebrate-specific member of the MCM2-8 protein family // *Gene*. - 2005. - V. 362. - P. 51-56.
165. Lutzmann M., Mechali M. MCM9 binds Cdt1 and is required for the assembly of prereplication complexes // *Mol Cell*. - 2008. - V. 31. - № 2. - P. 190-200.
166. Lyon M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) // *Nature*. - 1961. - V. 190. - P. 372-373.
167. Lyon M.F. X chromosomes and dosage compensation // *Nature*. - 1986. - V. 320. - № 6060. - P. 313.
168. Ma H., Siegel A.J., Berezney R. Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins // *J Cell Biol*. - 1999. - V. 146. - № 3. - P. 531-542.
169. MacAlpine D.M., Rodriguez H.K., Bell S.P. Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome // *Genes Dev*. - 2004. - V. 18. - № 24. - P. 3094-3105.
170. MacAlpine H.K., Gordan R., Powell S.K., Hartemink A.J., MacAlpine D.M. *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading // *Genome Res*. - 2010. - V. 20. - № 2. - P. 201-211.
171. Marchetti L., Comelli L., D'Innocenzo B., Puzzi L., Luin S., Arosio D., Calvello M., Mendoza-Maldonado R., Peverali F., Trovato F., Riva S., Biamonti G., Abdurashidova G., Beltram F., Falaschi A. Homeotic proteins participate in the function of human-DNA replication origins // *Nucleic Acids Res*. - 2010. - V. 38. - № 22. - P. 8105-8119.

172. Marheineke K., Hyrien O., Krude T. Visualization of bidirectional initiation of chromosomal DNA replication in a human cell free system // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - V. 33. - № 21. - P. 6931-6941.
173. Marks H., Chow J.C., Denissov S., Francoijs K.J., Brockdorff N., Heard E., Stunnenberg H.G. High-resolution analysis of epigenetic changes associated with X inactivation // *Genome Res.* - 2009. - V. 19. - № 8. - P. 1361-1373.
174. Martin M.M., Ryan M., Kim R., Zakas A.L., Fu H., Lin C.M., Reinhold W.C., Davis S.R., Bilke S., Liu H., Doroshov J.H., Reimers M.A., Valenzuela M.S., Pommier Y., Meltzer P.S., Aladjem M.I. Genome-wide depletion of replication initiation events in highly transcribed regions // *Genome Res.* - 2011. - V. 21. - № 11. - P. 1822-1832.
175. McConnell K.H., Dixon M., Calvi B.R. The histone acetyltransferases CBP and Chameau integrate developmental and DNA replication programs in *Drosophila* ovarian follicle cells // *Development.* - 2012. - V. 139. - № 20. - P. 3880-3890.
176. McGarry T.J., Kirschner M.W. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis // *Cell.* - 1998. - V. 93. - № 6. - P. 1043-1053.
177. Mechali M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2010. - V. 11. - № 10. - P. 728-738.
178. Mehta G.D., Kumar R., Srivastava S., Ghosh S.K. Cohesin: functions beyond sister chromatid cohesion // *FEBS Lett.* - 2013. - V. 587. - № 15. - P. 2299-2312.
179. Mendez J., Stillman B. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis // *Mol Cell Biol.* - 2000. - V. 20. - № 22. - P. 8602-8612.
180. Mesner L.D., Crawford E.L., Hamlin J.L. Isolating apparently pure libraries of replication origins from complex genomes // *Mol Cell.* - 2006. - V. 21. - № 5. - P. 719-726.
181. Mesner L.D., Valsakumar V., Cieslik M., Pickin R., Hamlin J.L., Bekiranov S. Bubble-seq analysis of the human genome reveals distinct chromatin-mediated mechanisms for regulating early- and late-firing origins // *Genome Res.* - 2013. - V. 23 - № 11 – P 1774-1788.

182. Mesner L.D., Valsakumar V., Karnani N., Dutta A., Hamlin J.L., Bekiranov S. Bubble-chip analysis of human origin distributions demonstrates on a genomic scale significant clustering into zones and significant association with transcription // *Genome Res.* - 2011. - V. 21. - № 3. - P. 377-389.
183. Michalet X., Ekong R., Fougerousse F., Rousseaux S., Schurra C., Hornigold N., van Slegtenhorst M., Wolfe J., Povey S., Beckmann J.S., Bensimon A. Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies // *Science.* - 1997. - V. 277. - № 5331. - P. 1518-1523.
184. Mikkelsen T.S., Ku M., Jaffe D.B., Issac B., Lieberman E., Giannoukos G., Alvarez P., Brockman W., Kim T.K., Koche R.P., Lee W., Mendenhall E., O'Donovan A., Presser A., Russ C., Xie X., Meissner A., Wernig M., Jaenisch R., Nusbaum C., Lander E.S., Bernstein B.E. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells // *Nature.* - 2007. - V. 448. - № 7153. - P. 553-560.
185. Miotto B., Struhl K. HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin // *Mol Cell.* - 2010. - V. 37. - № 1. - P. 57-66.
186. Miotto B., Struhl K. HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1 // *Genes Dev.* - 2008. - V. 22. - № 19. - P. 2633-2638.
187. Moyer S.E., Lewis P.W., Botchan M.R. Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2006. - V. 103. - № 27. - P. 10236-10241.
188. Nakamura H., Morita T., Sato C. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus // *Exp Cell Res.* - 1986. - V. 165. - № 2. - P. 291-297.
189. Navarro P., Avner P. An embryonic story: analysis of the gene regulative network controlling Xist expression in mouse embryonic stem cells // *Bioessays.* - 2010. - V. 32. - № 7. - P. 581-588.
190. Navarro P., Chantalat S., Foglio M., Chureau C., Vigneau S., Clerc P., Avner P., Rougeulle C. A role for non-coding Tsix transcription in partitioning chromatin

- domains within the mouse X-inactivation centre // *Epigenetics Chromatin*. - 2009. - V. 2. - № 1. - P. 8.
191. Navarro P., Page D.R., Avner P., Rougeulle C. Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program // *Genes Dev*. - 2006. - V. 20. - № 20. - P. 2787-2792.
192. Nesterova T.B., Slobodyanyuk S.Y., Elisaphenko E.A., Shevchenko A.I., Johnston C., Pavlova M.E., Rogozin I.B., Kolesnikov N.N., Brockdorff N., Zakian S.M. Characterization of the genomic Xist locus in rodents reveals conservation of overall gene structure and tandem repeats but rapid evolution of unique sequence // *Genome Res*. - 2001. - V. 11. - № 5. - P. 833-849.
193. Nishioka K., Rice J.C., Sarma K., Erdjument-Bromage H., Werner J., Wang Y., Chuikov S., Valenzuela P., Tempst P., Steward R., Lis J.T., Allis C.D., Reinberg D. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin // *Mol Cell*. - 2002. - V. 9. - № 6. - P. 1201-1213.
194. Norio P., Kosiyatrakul S., Yang Q., Guan Z., Brown N.M., Thomas S., Riblet R., Schildkraut C.L. Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development // *Mol Cell*. - 2005. - V. 20. - № 4. - P. 575-587.
195. Norseen J., Thomae A., Sridharan V., Aiyar A., Schepers A., Lieberman P.M. RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex // *EMBO J*. - 2008. - V. 27. - № 22. - P. 3024-3035.
196. Oda H., Okamoto I., Murphy N., Chu J., Price S.M., Shen M.M., Torres-Padilla M.E., Heard E., Reinberg D. Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development // *Mol Cell Biol*. - 2009. - V. 29. - № 8. - P. 2278-2295.
197. Ogawa Y., Takahashi T., Masukata H. Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins // *Mol Cell Biol*. - 1999. - V. 19. - № 10. - P. 7228-7236.
198. Ohhata T., Hoki Y., Sasaki H., Sado T. Tsix-deficient X chromosome does not undergo inactivation in the embryonic lineage in males: implications for Tsix-

- independent silencing of Xist // *Cytogenet Genome Res.* - 2006. - V. 113. - № 1-4. - P. 345-349.
199. Okuno Y., Satoh H., Sekiguchi M., Masukata H. Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin // *Mol Cell Biol.* - 1999. - V. 19. - № 10. - P. 6699-6709.
200. Pacek M., Walter J.C. A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication // *EMBO J.* - 2004. - V. 23. - № 18. - P. 3667-3676.
201. Paixao S., Colaluca I.N., Cubells M., Peverali F.A., Destro A., Giadrossi S., Giacca M., Falaschi A., Riva S., Biamonti G. Modular structure of the human lamin B2 replicator // *Mol Cell Biol.* - 2004. - V. 24. - № 7. - P. 2958-2967.
202. Pak D.T., Pflumm M., Chesnokov I., Huang D.W., Kellum R., Marr J., Romanowski P., Botchan M.R. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes // *Cell.* - 1997. - V. 91. - № 3. - P. 311-323.
203. Pardoll D.M., Vogelstein B., Coffey D.S. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells // *Cell.* - 1980. - V. 19. - № 2. - P. 527-536.
204. Patel P.K., Arcangioli B., Baker S.P., Bensimon A., Rhind N. DNA replication origins fire stochastically in fission yeast // *Mol Biol Cell.* - 2006. - V. 17. - № 1. - P. 308-316.
205. Patel P.K., Kommajosyula N., Rosebrock A., Bensimon A., Leatherwood J., Bechhoefer J., Rhind N. The Hsk1(Cdc7) replication kinase regulates origin efficiency // *Mol Biol Cell.* - 2008. - V. 19. - № 12. - P. 5550-5558.
206. Perkins T.T., Dalal R.V., Mitsis P.G., Block S.M. Sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules // *Science.* - 2003. - V. 301. - № 5641. - P. 1914-1918.
207. Perry P., Sauer S., Billon N., Richardson W.D., Spivakov M., Warnes G., Livesey F.J., Merckenschlager M., Fisher A.G., Azuara V. A dynamic switch in the replication timing of key regulator genes in embryonic stem cells upon neural induction // *Cell Cycle.* - 2004. - V. 3. - № 12. - P. 1645-1650.

208. Pesavento J.J., Yang H., Kelleher N.L., Mizzen C.A. Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle // *Mol Cell Biol.* - 2008. - V. 28. - № 1. - P. 468-486.
209. Petesch S.J., Lis J.T. Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci // *Cell.* - 2008. - V. 134. - № 1. - P. 74-84.
210. Phi-van L., Stratling W.H. An origin of bidirectional DNA replication is located within a CpG island at the 3' end of the chicken lysozyme gene // *Nucleic Acids Res.* - 1999. - V. 27. - № 15. - P. 3009-3017.
211. Picard F., Cadoret J.C., Audit B., Arneodo A., Alberti A., Battail C., Duret L., Prioleau M.N. The spatiotemporal program of DNA replication is associated with specific combinations of chromatin marks in human cells // *PLoS Genet.* - 2014. - V. 10. - № 5. - P. e1004282.
212. Pinto S., Quintana D.G., Smith P., Mihalek R.M., Hou Z.H., Boynton S., Jones C.J., Hendricks M., Velinzon K., Wohlschlegel J.A., Austin R.J., Lane W.S., Tully T., Dutta A. *latheo* encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant // *Neuron.* - 1999. - V. 23. - № 1. - P. 45-54.
213. Pope B.D., Hiratani I., Gilbert D.M. Domain-wide regulation of DNA replication timing during mammalian development // *Chromosome Res.* - 2010. - V. 18. - № 1. - P. 127-136.
214. Posfai E., Kunzmann R., Brochard V., Salvaing J., Cabuy E., Roloff T.C., Liu Z., Tardat M., van Lohuizen M., Vidal M., Beaujean N., Peters A.H. Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development // *Genes Dev.* - 2012. - V. 26. - № 9. - P. 920-932.
215. Prasanth S.G., Shen Z., Prasanth K.V., Stillman B. Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2010. - V. 107. - № 34. - P. 15093-15098.
216. Prioleau M.N., Gendron M.C., Hyrien O. Replication of the chicken beta-globin locus: early-firing origins at the 5' HS4 insulator and the rho- and betaA-

- globin genes show opposite epigenetic modifications // *Mol Cell Biol.* - 2003. - V. 23. - № 10. - P. 3536-3549.
217. Rastan S., Robertson E.J. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation // *J Embryol Exp Morphol.* - 1985. - V. 90. - P. 379-388.
218. Razin S.V., Kekelidze M.G., Lukanidin E.M., Scherrer K., Georgiev G.P. Replication origins are attached to the nuclear skeleton // *Nucleic Acids Res.* - 1986. - V. 14. - № 20. - P. 8189-8207.
219. Rein T., Kobayashi T., Malott M., Leffak M., DePamphilis M.L. DNA methylation at mammalian replication origins // *J Biol Chem.* - 1999. - V. 274. - № 36. - P. 25792-25800.
220. Reinberg D., Sims R.J., 3rd de FACTo nucleosome dynamics // *J Biol Chem.* - 2006. - V. 281. - № 33. - P. 23297-23301.
221. Rhind N. DNA replication timing: random thoughts about origin firing // *Nat Cell Biol.* - 2006. - V. 8. - № 12. - P. 1313-1316.
222. Rhind N., Gilbert D.M. DNA Replication Timing // *Cold Spring Harb Perspect Med.* - 2013. - V. 3. - № 7. - P. 1-26.
223. Romero J., Lee H. Asymmetric bidirectional replication at the human DBF4 origin // *Nat Struct Mol Biol.* - 2008. - V. 15. - № 7. - P. 722-729.
224. Rossant J. Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst // *Reprod Fertil Dev.* - 2007. - V. 19. - № 1. - P. 111-118.
225. Rowntree R.K., Lee J.T. Mapping of DNA replication origins to noncoding genes of the X-inactivation center // *Mol Cell Biol.* - 2006. - V. 26. - № 10. - P. 3707-3717.
226. Roy S., Ernst J., Kharchenko P.V., Kheradpour P., Negre N., Eaton M.L., Landolin J.M., Bristow C.A., Ma L., Lin M.F., Washietl S., Arshinoff B.I., Ay F., Meyer P.E., Robine N., Washington N.L., Di Stefano L., Berezhikov E., Brown C.D., Candeias R., Carlson J.W., Carr A., Jungreis I., Marbach D., Sealfon R., Tolstorukov M.Y., Will S., Alekseyenko A.A., Artieri C., Booth B.W., Brooks A.N., Dai Q., Davis C.A., Duff M.O., Feng X., Gorchakov A.A., Gu T., Henikoff J.G., Kapranov P., Li R., MacAlpine H.K., Malone J., Minoda A., Nordman J., Okamura K., Perry M., Powell S.K., Riddle N.C., Sakai A., Samsonova A., Sandler

- J.E., Schwartz Y.B., Sher N., Spokony R., Sturgill D., van Baren M., Wan K.H., Yang L., Yu C., Feingold E., Good P., Guyer M., Lowdon R., Ahmad K., Andrews J., Berger B., Brenner S.E., Brent M.R., Cherbas L., Elgin S.C., Gingeras T.R., Grossman R., Hoskins R.A., Kaufman T.C., Kent W., Kuroda M.I., Orr-Weaver T., Perrimon N., Pirrotta V., Posakony J.W., Ren B., Russell S., Cherbas P., Graveley B.R., Lewis S., Micklem G., Oliver B., Park P.J., Celniker S.E., Henikoff S., Karpen G.H., Lai E.C., MacAlpine D.M., Stein L.D., White K.P., Kellis M. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE // *Science*. - 2010. - V. 330. - № 6012. - P. 1787-1797.
227. Ryba T., Hiratani I., Lu J., Itoh M., Kulik M., Zhang J., Schulz T.C., Robins A.J., Dalton S., Gilbert D.M. Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types // *Genome Res*. - 2010. - V. 20. - № 6. - P. 761-770.
228. Sacco E., Hasan M.M., Alberghina L., Vanoni M. Comparative analysis of the molecular mechanisms controlling the initiation of chromosomal DNA replication in yeast and in mammalian cells // *Biotechnol Adv*. - 2012. - V. 30. - № 1. - P. 73-98.
229. Sadoni N., Cardoso M.C., Stelzer E.H., Leonhardt H., Zink D. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication // *J Cell Sci*. - 2004. - V. 117. - № Pt 22. - P. 5353-5365.
230. Saha P., Chen J., Thome K.C., Lawlis S.J., Hou Z.H., Hendricks M., Parvin J.D., Dutta A. Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase // *Mol Cell Biol*. - 1998. - V. 18. - № 5. - P. 2758-2767.
231. Saksouk N., Avvakumov N., Champagne K.S., Hung T., Doyon Y., Cayrou C., Paquet E., Ullah M., Landry A.J., Cote V., Yang X.J., Gozani O., Kutateladze T.G., Cote J. HBO1 HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail // *Mol Cell*. - 2009. - V. 33. - № 2. - P. 257-265.
232. Salsi V., Ferrari S., Ferraresi R., Cossarizza A., Grande A., Zappavigna V. HOXD13 binds DNA replication origins to promote origin licensing and is inhibited by geminin // *Mol Cell Biol*. - 2009. - V. 29. - № 21. - P. 5775-5788.

233. Sasaki T., Sawado T., Yamaguchi M., Shinomiya T. Specification of regions of DNA replication initiation during embryogenesis in the 65-kilobase DNAPolalpha-dE2F locus of *Drosophila melanogaster* // *Mol Cell Biol.* - 1999. - V. 19. - № 1. - P. 547-555.
234. Saxonov S., Berg P., Brutlag D.L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2006. - V. 103. - № 5. - P. 1412-1417.
235. Schaarschmidt D., Baltin J., Stehle I.M., Lipps H.J., Knippers R. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex // *EMBO J.* - 2004. - V. 23. - № 1. - P. 191-201.
236. Schepers A., Papior P. Why are we where we are? Understanding replication origins and initiation sites in eukaryotes using ChIP-approaches // *Chromosome Res.* - 2010. - V. 18. - № 1. - P. 63-77.
237. Schotta G., Sengupta R., Kubicek S., Malin S., Kauer M., Callen E., Celeste A., Pagani M., Opravil S., De La Rosa-Velazquez I.A., Espejo A., Bedford M.T., Nussenzweig A., Busslinger M., Jenuwein T. A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse // *Genes Dev.* - 2008. - V. 22. - № 15. - P. 2048-2061.
238. Schultz S.S., Desbordes S.C., Du Z., Kosiyatrakul S., Lipchina I., Studer L., Schildkraut C.L. Single-molecule analysis reveals changes in the DNA replication program for the POU5F1 locus upon human embryonic stem cell differentiation // *Mol Cell Biol.* - 2010. - V. 30. - № 18. - P. 4521-4534.
239. Schwaiger M., Kohler H., Oakeley E.J., Stadler M.B., Schubeler D. Heterochromatin protein 1 (HP1) modulates replication timing of the *Drosophila* genome // *Genome Res.* - 2010. - V. 20. - № 6. - P. 771-780.
240. Segal E., Widom J. Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization // *Curr Opin Struct Biol.* - 2009. - V. 19. - № 1. - P. 65-71.
241. Segurado M., de Luis A., Antequera F. Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe* // *EMBO Rep.* - 2003. - V. 4. - № 11. - P. 1048-1053.

242. Seo S., Herr A., Lim J.W., Richardson G.A., Richardson H., Kroll K.L. Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity // *Genes Dev.* - 2005. - V. 19. - № 14. - P. 1723-1734.
243. Sequeira-Mendes J., Diaz-Uriarte R., Apedaile A., Huntley D., Brockdorff N., Gomez M. Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells // *PLoS Genet.* - 2009. - V. 5. - № 4. - P. e1000446.
244. Shen Z., Sathyan K.M., Geng Y., Zheng R., Chakraborty A., Freeman B., Wang F., Prasanth K.V., Prasanth S.G. A WD-repeat protein stabilizes ORC binding to chromatin // *Mol Cell.* - 2010. - V. 40. - № 1. - P. 99-111.
245. Sher N., Bell G.W., Li S., Nordman J., Eng T., Eaton M.L., Macalpine D.M., Orr-Weaver T.L. Developmental control of gene copy number by repression of replication initiation and fork progression // *Genome Res.* - 2012. - V. 22. - № 1. - P. 64-75.
246. Shevchenko A.I., Malakhova A.A., Elisaphenko E.A., Mazurok N.A., Nesterova T.B., Brockdorff N., Zakian S.M. Variability of sequence surrounding the Xist gene in rodents suggests taxon-specific regulation of X chromosome inactivation // *PLoS One.* - 2011. - V. 6. - № 8. - P. e22771.
247. Shevchenko A.I., Pavlova S.V., Dementyeva E.V., Zakian S.M. Mosaic heterochromatin of the inactive X chromosome in vole *Microtus rossiaemeridionalis* // *Mamm Genome.* - 2009. - V. 20. - № 9-10. - P. 644-653.
248. Shirahige K., Hori Y., Shiraishi K., Yamashita M., Takahashi K., Obuse C., Tsurimoto T., Yoshikawa H. Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression // *Nature.* - 1998. - V. 395. - № 6702. - P. 618-621.
249. Sideridou M., Zakopoulou R., Evangelou K., Lontos M., Kotsinas A., Rampakakis E., Gagos S., Kahata K., Grabusic K., Gkouskou K., Trougakos I.P., Kolettas E., Georgakilas A.G., Volarevic S., Eliopoulos A.G., Zannis-Hadjopoulos M., Moustakas A., Gorgoulis V.G. Cdc6 expression represses E-cadherin transcription and activates adjacent replication origins // *J Cell Biol.* - 2011. - V. 195. - № 7. - P. 1123-1140.
250. Simpson R.T. Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element in vivo // *Nature.* - 1990. - V. 343. - № 6256. - P. 387-389.

251. Sporbert A., Gahl A., Ankerhold R., Leonhardt H., Cardoso M.C. DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters // *Mol Cell*. - 2002. - V. 10. - № 6. - P. 1355-1365.
252. Staib C., Grummt F. Mapping replication origins by nascent DNA strand length // *Methods*. - 1997. - V. 13. - № 3. - P. 293-300.
253. Stanojcic S., Lemaitre J.M., Brodolin K., Danis E., Mechali M. In *Xenopus* egg extracts, DNA replication initiates preferentially at or near asymmetric AT sequences // *Mol Cell Biol*. - 2008. - V. 28. - № 17. - P. 5265-5274.
254. Stavropoulos N., Lu N., Lee J.T. A functional role for Tsix transcription in blocking Xist RNA accumulation but not in X-chromosome choice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2001. - V. 98. - № 18. - P. 10232-10237.
255. Strehl S., LaSalle J.M., Lalande M. High-resolution analysis of DNA replication domain organization across an R/G-band boundary // *Mol Cell Biol*. - 1997. - V. 17. - № 10. - P. 6157-6166.
256. Stroud H., Otero S., Desvoyes B., Ramirez-Parra E., Jacobsen S.E., Gutierrez C. Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2012. - V. 109. - № 14. - P. 5370-5375.
257. Sugimoto N., Kitabayashi I., Osano S., Tatsumi Y., Yugawa T., Narisawa-Saito M., Matsukage A., Kiyono T., Fujita M. Identification of novel human Cdt1-binding proteins by a proteomics approach: proteolytic regulation by APC/CCdh1 // *Mol Biol Cell*. - 2008. - V. 19. - № 3. - P. 1007-1021.
258. Sugimoto N., Yugawa T., Iizuka M., Kiyono T., Fujita M. Chromatin remodeler sucrose nonfermenting 2 homolog (SNF2H) is recruited onto DNA replication origins through interaction with Cdc10 protein-dependent transcript 1 (Cdt1) and promotes pre-replication complex formation // *J Biol Chem*. - 2011. - V. 286. - № 45. - P. 39200-39210.
259. Sun B.K., Deaton A.M., Lee J.T. A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization // *Mol Cell*. - 2006. - V. 21. - № 5. - P. 617-628.
260. Sun S., Del Rosario B.C., Szanto A., Ogawa Y., Jeon Y., Lee J.T. Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF // *Cell*. - 2013. - V. 153. - № 7. - P. 1537-1551.

261. Swarnalatha M., Singh A.K., Kumar V. The epigenetic control of E-box and Myc-dependent chromatin modifications regulate the licensing of lamin B2 origin during cell cycle // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - V. 40. - № 18. - P. 9021-9035.
262. Takahashi T.S., Yiu P., Chou M.F., Gygi S., Walter J.C. Recruitment of *Xenopus* Scc2 and cohesin to chromatin requires the pre-replication complex // *Nat Cell Biol.* - 2004. - V. 6. - № 10. - P. 991-996.
263. Takayama Y., Kamimura Y., Okawa M., Muramatsu S., Sugino A., Araki H. GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast // *Genes Dev.* - 2003. - V. 17. - № 9. - P. 1153-1165.
264. Tan B.C., Chien C.T., Hirose S., Lee S.C. Functional cooperation between FACT and MCM helicase facilitates initiation of chromatin DNA replication // *EMBO J.* - 2006. - V. 25. - № 17. - P. 3975-3985.
265. Tan B.C., Liu H., Lin C.L., Lee S.C. Functional cooperation between FACT and MCM is coordinated with cell cycle and differential complex formation // *J Biomed Sci.* - 2010. - V. 17. - P. 11.
266. Tardat M., Brustel J., Kirsh O., Lefevbre C., Callanan M., Sardet C., Julien E. The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells // *Nat Cell Biol.* - 2010. - V. 12. - № 11. - P. 1086-1093.
267. Tardat M., Murr R., Herceg Z., Sardet C., Julien E. PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase // *J Cell Biol.* - 2007. - V. 179. - № 7. - P. 1413-1426.
268. Tatsumi Y., Ohta S., Kimura H., Tsurimoto T., Obuse C. The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1 // *J Biol Chem.* - 2003. - V. 278. - № 42. - P. 41528-41534.
269. Thomae A.W., Pich D., Brocher J., Spindler M.P., Berens C., Hock R., Hammerschmidt W., Schepers A. Interaction between HMGA1a and the origin recognition complex creates site-specific replication origins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008. - V. 105. - № 5. - P. 1692-1697.
270. Tsai C.L., Rowntree R.K., Cohen D.E., Lee J.T. Higher order chromatin structure at the X-inactivation center via looping DNA // *Dev Biol.* - 2008. - V. 319. - № 2. - P. 416-425.

271. Valenzuela M.S., Chen Y., Davis S., Yang F., Walker R.L., Bilke S., Lueders J., Martin M.M., Aladjem M.I., Massion P.P., Meltzer P.S. Preferential localization of human origins of DNA replication at the 5'-ends of expressed genes and at evolutionarily conserved DNA sequences // *PLoS One*. - 2011. - V. 6. - № 5. - P. e17308.
272. Valton A.L., Hassan-Zadeh V., Lema I., Boggetto N., Alberti P., Saintome C., Riou J.F., Prioleau M.N. G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators // *EMBO J*. - 2014. - V. 33. - № 7. - P. 732-746.
273. Vashee S., Cvetic C., Lu W., Simancek P., Kelly T.J., Walter J.C. Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex // *Genes Dev*. - 2003. - V. 17. - № 15. - P. 1894-1908.
274. Vassetzky Y., Hair A., Mechali M. Rearrangement of chromatin domains during development in *Xenopus* // *Genes Dev*. - 2000. - V. 14. - № 12. - P. 1541-1552.
275. Vassetzky Y.S., Bogdanova A.N., Razin S.V. Analysis of the chicken DNA fragments that contain structural sites of attachment to the nuclear matrix: DNA-matrix interactions and replication // *J Cell Biochem*. - 2000. - V. 79. - № 1. - P. 1-14.
276. Vassilev L.T., Burhans W.C., DePamphilis M.L. Mapping an origin of DNA replication at a single-copy locus in exponentially proliferating mammalian cells // *Mol Cell Biol*. - 1990. - V. 10. - № 9. - P. 4685-4689.
277. Vermeulen M., Eberl H.C., Matarese F., Marks H., Denissov S., Butter F., Lee K.K., Olsen J.V., Hyman A.A., Stunnenberg H.G., Mann M. Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers // *Cell*. - 2010. - V. 142. - № 6. - P. 967-980.
278. Vogelauer M., Rubbi L., Lucas I., Brewer B.J., Grunstein M. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing // *Mol Cell*. - 2002. - V. 10. - № 5. - P. 1223-1233.
279. Volkening M., Hoffmann I. Involvement of human MCM8 in prereplication complex assembly by recruiting hcdc6 to chromatin // *Mol Cell Biol*. - 2005. - V. 25. - № 4. - P. 1560-1568.

280. Walter J., Newport J.W. Regulation of replicon size in *Xenopus* egg extracts // *Science*. - 1997. - V. 275. - № 5302. - P. 993-995.
281. Watanabe Y., Tenzen T., Nagasaka Y., Inoko H., Ikemura T. Replication timing of the human X-inactivation center (XIC) region: correlation with chromosome bands // *Gene*. - 2000. - V. 252. - № 1-2. - P. 163-172.
282. Weinreich M., Palacios DeBeer M.A., Fox C.A. The activities of eukaryotic replication origins in chromatin // *Biochim Biophys Acta*. - 2004. - V. 1677. - № 1-3. - P. 142-157.
283. White E.J., Emanuelsson O., Scalzo D., Royce T., Kosak S., Oakeley E.J., Weissman S., Gerstein M., Groudine M., Snyder M., Schubeler D. DNA replication-timing analysis of human chromosome 22 at high resolution and different developmental states // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2004. - V. 101. - № 51. - P. 17771-17776.
284. Wohlschlegel J.A., Dhar S.K., Prokhorova T.A., Dutta A., Walter J.C. *Xenopus* Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45 // *Mol Cell*. - 2002. - V. 9. - № 2. - P. 233-240.
285. Wong P.G., Glozak M.A., Cao T.V., Vaziri C., Seto E., Alexandrow M. Chromatin unfolding by Cdt1 regulates MCM loading via opposing functions of HBO1 and HDAC11-geminin // *Cell Cycle*. - 2010. - V. 9. - № 21. - P. 4351-4363.
286. Wong P.G., Winter S.L., Zaika E., Cao T.V., Oguz U., Koomen J.M., Hamlin J.L., Alexandrow M.G. Cdc45 limits replicon usage from a low density of preRCs in mammalian cells // *PLoS One*. - 2011. - V. 6. - № 3. - P. e17533.
287. Wyrick J.J., Aparicio J.G., Chen T., Barnett J.D., Jennings E.G., Young R.A., Bell S.P., Aparicio O.M. Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins // *Science*. - 2001. - V. 294. - № 5550. - P. 2357-2360.
288. Xu J., Yanagisawa Y., Tsankov A.M., Hart C., Aoki K., Kommajosyula N., Steinmann K.E., Bochicchio J., Russ C., Regev A., Rando O.J., Nusbaum C., Niki H., Milos P., Weng Z., Rhind N. Genome-wide identification and characterization of replication origins by deep sequencing // *Genome Biol*. - 2012. - V. 13. - № 4. - P. R27.

289. Xu W., Aparicio J.G., Aparicio O.M., Tavare S. Genome-wide mapping of ORC and Mcm2p binding sites on tiling arrays and identification of essential ARS consensus sequences in *S. cerevisiae* // *BMC Genomics*. - 2006. - V. 7. - P. 276.
290. Xu X., Rochette P.J., Feyissa E.A., Su T.V., Liu Y. MCM10 mediates RECQ4 association with MCM2-7 helicase complex during DNA replication // *EMBO J.* - 2009. - V. 28. - № 19. - P. 3005-3014.
291. Yaffe E., Farkash-Amar S., Polten A., Yakhini Z., Tanay A., Simon I. Comparative analysis of DNA replication timing reveals conserved large-scale chromosomal architecture // *PLoS Genet.* - 2010. - V. 6. - № 7. - P. e1001011.
292. Yin S., Deng W., Hu L., Kong X. The impact of nucleosome positioning on the organization of replication origins in eukaryotes // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2009. - V. 385. - № 3. - P. 363-368.
293. Yoshida K. Identification of a novel cell-cycle-induced MCM family protein MCM9 // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2005. - V. 331. - № 2. - P. 669-674.
294. Zhou J., Ashouian N., Delepine M., Matsuda F., Chevillard C., Riblet R., Schildkraut C.L., Birshstein B.K. The origin of developmentally regulated *Igh* replication is located near the border of regulatory domains for *Igh* replication and expression // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2002. - V. 99. - № 21. - P. 13693-13698.
295. Zhou J., Chau C.M., Deng Z., Shiekhattar R., Spindler M.P., Schepers A., Lieberman P.M. Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication // *EMBO J.* - 2005. - V. 24. - № 7. - P. 1406-1417.
296. Zou L., Stillman B. Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase // *Mol Cell Biol.* - 2000. - V. 20. - № 9. - P. 3086-3096.