

ОТЗЫВ

на диссертацию Васьковой Евгении Андреевны «МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА ПРИ ИНАКТИВАЦИИ Х-ХРОМОСОМЫ У ГРЫЗУНОВ», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «Генетика»

Современный этап развития геномики характеризуется значительным смещением центра исследований от тестирования полиморфизма генов и секвенирования генома к пониманию эпигенетических механизмов регуляции его функций. Наряду с метилированием и спектрами регуляторных микроРНК, важная роль в регуляции активности генома принадлежит процессам гетерохроматизации. Удобной естественной моделью для исследований процессов гетерохроматизации, как в онтогенетическом, так и в филогенетическом плане является инактивация одной из Х-хромосом у млекопитающих женского пола. Большое фундаментальное и практическое значение подобных исследований, уже много лет выполняемых в лабораторией эпигенетики развития ФГБУ «Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск) не вызывает сомнения

Диссертация Е.А.Васьковой написана по традиционному плану, состоит из Введения (7 стр.) и 3х глав: Обзор литературы (27 стр.), Материал и методы (10 стр.), результаты и обсуждение (24стр), Заключение (2 стр.), Выводов (1 стр.) и списка литературы (17 стр., 139 ист.).

Во Введении кратко обосновывается актуальность темы, рассмотрены три известные формы инактивации Х-хромосомы: мейотическая, импринтированная и случайная. Отмечается, что мейотическая характерна для сперматогенеза и связана с формированием полового пузырька, тогда как импринтированная и случайная формы инактивации имеют место у самок высших млекопитающих. Импринтированная инактивация, т.е. инактивация Х-хромосомы, унаследованной от отца (Хр), имеет место во всех тканях у сумчатых млекопитающих и на предимплантационных стадиях развития у плацентарных; её молекулярную основу составляет экспрессия гена *Xist* (*X inactive specific transcript*), локализованного в специфическом локусе – центре инактивации Х-хромосомы, транскрибирующим длинную некодирующую ядерную РНК.

Ключевым этапом при *Xist*-зависимой или *Xist*-независимой инактивации, является аккумуляция или утрата определенной комбинации модификаций гистонов. Выяснение вопроса о том, какие системы сайленсинга участвуют в формировании гетерохроматина неактивной Х-хромосомы при различных формах инактивации, представляет собой фундаментальную задачу современной биологии

Формулируются цели и задачи исследования, приводится научная новизна полученных результатов, их теоретическая и практическая значимость, а также личный вклад автора, который не вызывает сомнения. Приведены справка об апробации работы и выходные данные 3-х публикаций по теме диссертации, входящих в рекомендованный список ВАК.

Замечаний у оппонента по данному разделу нет

Глава 1 (обзор литературы) изложена на 30 стр. В ней подробно рассмотрены феномен мейотической инактивации Х хромосомы, динамика модификации хроматина половых хромосом на разных стадиях сперматогенеза, Приведены удачные схемы модификации хроматина во время сперматогенеза (рис.2 стр.19) и Х-инактивации в раннем развитии мышей (рис.3, стр.29). Отмечается, что у мыши инактивация Х-хромосомы во время предимплантационного развития является импринтированной, неполной и обратимой, при этом у разных видов плацентарных

млекопитающих набор модификаций, выявляемых на неактивной X-хромосоме, практически одинаков, однако существуют различия в эмбриональном развитии, в том числе связанные с инициацией процесса инактивации. Подробно рассмотрены: динамика модификаций хроматина половых хромосом на разных стадиях сперматогенеза, механизмы мейотической инактивации половых хромосом, экспрессия генов половых хромосом в мейозе и на постмейотических стадиях.

Специальный раздел посвящен феномену инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих. Рассмотрена динамика модификации хроматина неактивной X-хромосомы в онтогенезе самок плацентарных млекопитающих. Отмечено, что изменения в структуре хроматина инактивируемой X-хромосомы определяются только начиная с 8-клеточной стадии у мышей и значительно позже (на стадии поздней бластоцисты) у сумчатых, у которых импринтированная инактивация является неполной и тканеспецифичной, у них не найдено ортолога гена *Xist* Модификации гистонов, ассоциированных с транскрипционно активным состоянием хроматина, выявляются при импринтированной инактивации у плацентарных и у сумчатых, что, вероятно, отражает наиболее древнюю стадию процесса инактивации X-хромосомы. В 3-м разделе обзора подробно рассмотрены два типа факультативного гетерохроматина неактивной X-хромосомы, механизмы, обеспечивающие установление этих модификаций, а также мейотическая инактивация как возможный предковый механизм импринтированной инактивации. Подчеркивается, что до сих пор остается невыясненным вопрос о природе импринтинга, т.е. почему на предимплантационных стадиях инактивируется X-хромосома, унаследованная от отца.

Знакомство с обзором литературы оставляет самое благоприятное впечатление, не вызывает сомнения глубокое знание соискателем существа проблемы и путей её решения. Удачно и уместно дано заключение, из которого следует, что распределение на неактивной X-хромосоме модификаций гистонов в процессе импринтированной инактивации и природа данной формы инактивации остаются неизученными, нет полной картины распределения модификаций в процессе случайной инактивации.

Замечаний по данной главе диссертации Е.А. Васьковой у оппонента нет.

Глава 2 - Материалы и методы - занимает 10 страниц. Работа выполнена на трех видах грызунов: полевка, домовая мышь и крыса. Использован большой арсенал современных цитологических, цитогенетических, иммуноцитохимических и молекулярных методов исследований. Разнообразный материал, широкий спектр использованных методов свидетельствуют о высоком уровне проведенных исследований.

В разделе 2.5 следовало бы уточнить как проводили иммуноокрашивание мейотических хромосом и сколько пахитен анализировали.

Глава 3 - Результаты и обсуждение - сравнительно небольшая по объему (25 стр), но очень информативная по содержанию и прекрасно иллюстрирована многочисленными фотодокументами и рисунками, включает результаты исследования модификаций неактивного хроматина X-хромосомы в составе полового тельца в процессе мейотического и постмейотического сайленсинга, а также импринтированной инактивации X-хромосомы у полевки. Специальный раздел посвящен получению и анализу трофобластических стволовых (ТС) клеток полевки и анализу в них модификаций X-хроматина. Установлено, что в недифференцированных ТС клетках полевки структура хроматина представлена уникальным спектром модификаций маркеров первого (uH2A) и второго (триметилированных H3K9, H4K20 и HP1) типов гетерохроматина, формирующих единую систему сайленсинга, варьирующую в зависимости от стадии развития. Отдельно соискателем изучены модификации Y-хроматина в ТС клетках полевки. Сходство структуры хроматина на мейотических, постмейотических стадиях сперматогенеза и на ранних этапах импринтированной инактивации позволило соискателю сформулировать гипотезу, согласно которой отцовская X хромосома предрасположена к инактивации, так

как переходит в зиготу уже в преинактивированном состоянии в результате наследования ряда маркеров неактивного хроматина, приобретенных в процессе мейотической инактивации - гипотеза «преинактивированного» состояния Xp. Процесс импринтированной инактивации включает в себя *Xist*-независимый и *Xist*-зависимый этапы, причем первый длится от стадии 2-х бластомеров до стадии бластоцисты.

Таким образом, соискателем впервые было показано участие *Xist*-независимой системы сайленсинга (триметилированный H3K9/HP1) в структуре хроматина неактивной X-хромосомы.

Высоко оценивая научный вклад и методический уровень проведенного исследования, хотел бы сделать некоторые замечания и прояснить некоторые вопросы:

- 1) Препараты из семенников характеризуются наличием разных типов клеток – как сперматогенного ряда, так и соматических. Из текста не ясно, как отличали ядра сперматид от других типов клеток? Только на основании размера ядра? Проводили ли FISH анализ для подтверждения гаплоидности?
- 2) Почему эпигенетический анализ X-хромосомы в процессе мейотического сайленсинга проводили только на пахитенных хромосомах, а не на других стадиях мейоза?
- 3) Как отличали активную X-хромосому (Xa) от инактивированной (Xi) при анализе метафазных хромосом? При прочтении складывается впечатление, что по набору эпигенетических модификаций; однако, именно набор эпигенетических модификаций X-хромосом является предметом исследования автора, следовательно, для идентификации активной и инактивированной хромосом X необходимо применять другой критерий, например, использовать методику с бромдезоксипуридином (BrdU).
- 4) Препараты метафазных хромосом, зафиксированные параформальдегидом, и приготовленные с помощью цитоцентрифугирования, обычно имеют невысокое качество дифференциального окрашивания по сравнению с препаратами, зафиксированными метанол-уксусным фиксатором. На всех ли анализируемых метафазных пластинках можно было идентифицировать X-хромосомы? Всегда ли применяли FISH с MS4 пробой для детекции X-хромосом на интерфазных ядрах (так, например, в отношении рис. 13 это не ясно)?
- 5) Наконец, основная часть работы по анализу механизмов импринтированного и случайного сайленсинга X-хромосомы была выполнена на стволовых клетках трофобласта. Где уверенность в том, что изучаемые процессы на культуре ТС аналогичны таковым *in vivo*, то есть в реальных клетках трофобласта развивающихся зародышей? Сравнивали ли эти процессы с таковыми в эмбриобласте (клетках ВКМ) ?

Результаты диссертационной работы Васьковой Евгении Андреевны суммированы в 5 выводах, которые полностью и объективно отражают результаты проведенного исследования. Материалы диссертации неоднократно докладывались на научных конференциях, представлены в 3 публикациях, входящих список ВАК.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Научная новизна полученных результатов, их большая значимость очевидны. Проведенный анализ позволил существенно уточнить механизмы всех типов инактивации X-хромосомы, выяснить особенности репрограммирования гистоновых белков и сформулировать гипотезу «преинактивированного» состояния отцовской X-хромосомы, объясняющую её избирательное «выключение» на начальных стадиях эмбриогенеза. Впервые показано участие *Xist*-независимой системы сайленсинга в структуре хроматина неактивной X-хромосомы. Относительно практической значимости следует отметить, что согласно недавно опубликованным данным (Jiung et al., 2013), с помощью направленного переноса гена *Xist* в лишнюю хромосому 21 удалось добиться её выключения и, таким образом, исправить *in vitro* дефект, связанный с трисомией хромосомы 21 - самой частой хромосомной болезнью у человека. Следовательно,

результаты работы могут найти применение в дальнейшем развитии практически важных исследований по генной терапии болезни Дауна.

Заключение

Проведенное рецензирование свидетельствует о безусловном соответствии требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатской диссертации, а её автор Васькова Евгения Андреевна заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 0.3.02.07 – Генетика.

Зав.лабораторией пренатальной диагностики
член –корр. РАМН, профессор, з.д.н. РФ

В.С.Баранов

Подпись В.С.Баранова заверяю

Ученый секретарь
ФГБУ «НИИАГ им.Д.О.Отта» СЗО РАМН
д.м.н., доц.



И.Ю.Коган

ФГБУ «НИИАГ им.Д.О.Отта» СЗО РАМН
Менделеевская 3, Санкт-Петербург, 199034