

### Отзыв официального оппонента

на работу Е.А. Васьковой «Модификации хроматина при инактивации X-хромосомы у грызунов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Инактивация генетического материала является одним из главных аспектов проблемы регуляции экспрессии генов, которые в настоящее время интенсивно изучаются на молекулярном уровне. Генетическая инактивация (сайленсинг) может регулировать работу генов на уровне отдельных локусов, протяженных хромосомных доменов и целых хромосом. Диссертация Е.А. Васьковой «Модификации хроматина при инактивации X-хромосомы у грызунов», посвященная изучению механизмов сайленсинга одной из X-хромосом у самок млекопитающих, продолжает серию исследований, давно и успешно проводимых в лаборатории эпигенетики развития в Институте цитологии и генетики СО РАН под руководством С.М. Закияна. Актуальность этих работ не вызывает сомнения.

В рецензируемой работе основное внимание направлено на выяснение механизмов, приводящих к сайленсингу X-хромосомы полевки *Microtus levis* в период раннего эмбриогенеза, когда сайленсинг затрагивает только X-хромосому, унаследованную от отца, т.е. не является случайным. Феномен неслучайной инактивации X-хромосомы известен для всех тканей сумчатых и часто встречается в экстра-эмбриональных тканях высших млекопитающих; его механизмы во многом остаются непонятными.

Исследования последних лет установили, как минимум, два молекулярных механизма эпигенетического сайленсинга (HP1- и Pc-G-зависимые), различающихся хромосомными белками и модификациями гистонов.

В диссертации Е.А. Васьковой репрессирующие белковые комплексы выявлялись методом иммунофлуоресцентных окрасок с использованием антител на исследуемые белки и гистоновые модификации: HP1, H3K27me3, H3K9me3, H4K20me3, UH2A и некоторые другие.

Анализ был проведен на мейотических и постмейотических стадиях формирования гамет самца, на ТС-клетках (в культурах, полученных из предимплантационных

эмбрионов) полевки и мыши, эмбриональных фибробластов крысы; круг исследуемых типов клеток, таким образом, весьма широкий.

Наиболее важным результатом работы является впервые выявленная динамика распределения репрессирующих белков в инактивируемой X-хромосоме в ходе дифференцировки ТС-клеток. На ранних стадиях наблюдалось преобладание в хромосомах меток H3K9, H4K20 и HP1- маркеров, характерных для сайленсинга постоянно репрессированных гетерохроматиновых районов хромосом. Затем в процессе дифференцировки этот тип сайленсинга постепенно дополнялся Pc-G зависимым, маркером которого является H3K27me3 модификация. Аналогичная ситуация обнаружена на ранних стадиях неслучайной инактивации X-хромосомы у мыши. Ранее у мыши тип сайленсинга HP1-H3K9 на этих стадиях не был известен.

Возникает вопрос – почему происходит неслучайная инактивация отцовской X-хромосомы. Для ответа на этот вопрос автор исследовала состояние X-хромосомы в мейозе и при формировании гамет самца и показала, что на этих этапах X-хромосома уже несет те маркеры инактивации, которые наблюдаются в раннем эмбриогенезе – HP1- и H3K9. Эти результаты поддерживают идею о прединактивации отцовской X-хромосомы в гаметах как механизме неслучайности ее сайленсинга в развивающейся зиготе.

Наконец, в последнем разделе результатов приведены данные о распределении репрессирующих маркеров в клетках эмбриональных фибробластов крысы, которые впервые показали, что случайная X-инактивация у этого объекта связана с наличием обоих типов маркеров – HP1-H3K9 и Pc-G сайленсерами, по-видимому составляющими универсальную систему инактивации X-хромосомы у млекопитающих.

Новизна и значение полученных результатов состоят в вовлечении в исследование новых объектов, типов клеток и стадий онтогенеза. Они показывают разнообразие и в то же время определенный консерватизм механизмов сайленсинга. Особенно важно то, что картины динамических преобразований, происходящих с хроматином X-хромосом в индивидуальном развитии, в известной мере отражают закономерности становления механизмов X-инактивации в эволюционном плане: на ранних стадиях развития

механизмы инактивации X-хромосомы у высших плацентарных млекопитающих напоминают таковые у сумчатых с их неслучайной инактивацией во всех тканях.

Выводы работы достаточно обоснованы фактическим материалом, достоверность которого хорошо иллюстрируется на многочисленных фотографиях иммунофлуоресцентно окрашенных препаратов высокого качества. Выводы очень конкретны, даже можно сказать скупы, хотя автор имел основания и для более широких обобщений. Кроме метода иммунофлуоресцентной микроскопии, весьма трудоемкого и капризного, которым автор владеет в совершенстве, в работе использовались и многие другие методы современной молекулярной биологии, включая получение и характеристики клеточных культур.

Диссертация написана хорошим научным языком, достаточно полно снабжена иллюстративным материалом.

Обзор данных литературы, объем которой по обсуждаемым вопросам очень велик, дает ясное представление о современном состоянии знаний в рамках темы работы и логично подводит в постановке задач собственных исследований автора.

Диссертация Е.А. Васьковой представляет собой цельное и завершенное исследование, т.к. в ней получены ответы на все поставленные вопросы. В то же время эта работа является базой для дальнейшего изучения процессов инактивации генетического материала на новых экспериментальных моделях, например, анализе механизмов сайленсинга на генном уровне, механизмов рекрутирования хромосомных белков-сайленсеров и роли отдельных модификаций гистонов и т. д.

В целом можно приветствовать краткость изложения материалов диссертации, но в некоторых случаях она кажется излишней. Это замечание касается, например, описания культуры ТС клеток, в частности, уровня плоидности, кариологической характеристики и критериев дифференцировки. Не были бы лишними и более подробные подписи под рисунками (некоторыми) и шкалы масштабов. Стоило бы, наверное, более четко акцентировать вопрос о Xist-зависимости и независимости распределения маркеров сайленсинга на репрессированной X-хромосоме, а также о соотношении сигналов использованных меток в интерфазных и метафазных хромосомах. Однако очевидно, что эти замечания не влияют на обоснованность сделанных в работе выводов.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в автореферате и публикациях автора.

В целом, по актуальности, новизне, объему, достоверности фактического материала, важности результатов, уровню публикаций рецензируемая работа «Модификации хроматина при инактивации X-хромосомы у грызунов», удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям; квалификация ее автора, Е.А. Васьковой, несомненно, соответствует ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Главный научный сотрудник лаборатории  
молекулярной цитогенетики Федерального  
государственного учреждения науки  
Институт молекулярной и клеточной  
биологии СО РАН,

профессор, д.б.н.

Беляева Е.С.

Почтовый адрес: г. Новосибирск, 630090, пр. ак. Лаврентьева 8/2.

Тел.: 363-90-57

e-mail: belyaeva@mcb.nsc.ru

