

## ОТЗЫВ

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

Диссертационная работа Шерстюка В. В. посвящена исследованию локализации ориджинов репликации млекопитающих на примере локуса центра инактивации X-хромосомы восточноевропейской полевки *Microtus levis* Miller.

Репликация эукариотических хромосом инициируется в специальных участках – ориджинах репликации. Линейные хромосомы эукариот могут содержать несколько сотен ориджинов (в геноме человека выявлено не менее 10 000 ориджинов), репликация в которых инициируется не синхронно, а в определенном порядке, но не более одного раза за клеточный цикл. Точная регуляция инициации репликации необходима для нормальной жизнедеятельности клетки, а ее нарушение приводит к разнообразным цитогенетическим нарушениям. Однако большая часть информации о механизме инициации эукариотической репликации получена на примере одноклеточных организмов (пивные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжи-дробянки *Schizosaccharomyces pombe*), а процесс инициации репликации высших эукариот остается слабо исследованным. Даже позиции ориджинов в большинстве случаев картированы весьма приблизительно. В связи с этим актуальность представленной работы, посвященной подробному картированию ориджинов репликации в локусе инактивации X-хромосомы *M. levis*, который достаточно хорошо изучен функционально в отношении других молекулярно-генетических процессов, не вызывает никакого сомнения.

Диссертационная работа Шерстюка В. В. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 296 статей, большая часть которых вышла в течение последних 10 лет. Работа изложена на 137 страницах, проиллюстрирована 31 рисунком, содержит 4 таблицы.

Во введении диссертант обосновывает актуальность работы, формулирует цель и задачи исследования, суммирует научную новизну полученных результатов, определяет теоретическую и практическую значимость исследования, описывает свой личный вклад в выполнение работы, перечисляет статьи, в которых были представлены результаты, и конференции, на которых они были доложены.

Обзор литературы разбит на две неравные части — «Ориджины репликации эукариот» и «Центр инактивации X-хромосомы». В первой, большей по объему части дан впечатляющий по своей детальности систематический анализ современного состояния знаний о механизме инициации репликации на эукариотических ориджинах и о последовательностях ДНК, характерных для этих областей. Отдельный раздел обзора литературы посвящен методам картирования ориджинов репликации эукариот — как тем, которые диссертант непосредственно использовал в своей работе, так и альтернативным — и сравнительному анализу их преимуществ и ограничений. Ввиду бурного развития в последние годы новых высокопроизводительных методов картирования функциональных элементов генома включение такого раздела представляется вполне обоснованным. Далее диссертант рассматривает разнообразные способы регулирования эффективности инициации репликации на разных уровнях, в том числе роль структурных белков хроматина, факторов транскрипции и ремоделинга хроматина, пространственную и временную организацию и координацию репликации генома высших эукариот. Вторая часть литературного обзора представляет собой непосредственное введение в объект диссертационной работы. Она содержит описание структуры центра инактивации X-хромосомы домового мыши *Mus musculus* и восточноевропейской полевки *M. levis* вместе с подробным анализом сделанных за последние годы работ по характеристике ориджинов репликации *M. musculus* в этой области генома. Следует отметить, что центр инактивации X-хромосомы *M. levis* подвергся значительной перестройке по сравнению с аналогичным локусом *M. musculus*, и сравнительный анализ карты ориджинов в этих двух родственных видах представляет значительный интерес для понимания хромосомной эволюции млекопитающих. Литературный обзор хорошо проиллюстрирован картами локусов, схемами молекулярно-генетических процессов и принципов аналитических методов, что значительно облегчает его чтение. В целом литературный обзор отвечает поставленным задачам.

Глава «Материалы и методы» содержит описание современных биохимических и физико-химических подходов и методов, использованных в работе. Большую часть из них составляют стандартные молекулярно-биологические и цитологические методы: вестерн-блоттинг, иммунофлуоресцентная микроскопия, полимеразная цепная реакция и т. п. Особый интерес среди использованных методов вызывают селективное выделение новосинтезированной ДНК из асинхронных клеточных культур, а также иммунопреципитация хроматина с антителами к модифицированным гистонам и компоненту комплекса распознавания ориджинов ORC4 — два основных метода, при помощи которых диссертант проводил обогащение фракции ДНК последовательностями, локализованными вблизи ориджинов репликации. Также весьма важно, что диссертант осуществил проверку

работоспособности всех использованных в работе антител, не полагаясь исключительно на спецификации производителей. Большинство методов описано очень детально, что в ряде случаев даже излишне — например, вряд ли имело смысл повторять инструкции фирмы-производителя при использовании наборов для выделения ДНК и РНК, если только автор не вносил в них какие-то модификации. В целом глава «Экспериментальная часть» хорошо отражает использованные в работе методы.

При описании полученных результатов диссертант в целом придерживается порядка поставленных в работе задач: картирование активных ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы в нескольких типах клеток самцов *M. levis*, картирование и анализ нуклеотидного состава сайтов связывания комплекса ORC в этом локусе, картирование распределения гистона H3, его варианта H3.3, ацетилизованного H3K9, метилированного H4K20 и триметилированного H3K27 и сравнительный анализ ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы *M. levis* и *M. musculus*. Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 7 разделов, описывающих основные результаты диссертации.

Для картирования ориджинов репликации диссертантом был выбран метод анализа количества новосинтезированных цепей ДНК, который позволяет непосредственно установить, какие участки хромосомы реплицируются сразу после инициации. Данным методом были исследованы три типа клеток самцов *M. levis* — трофобластные стволовые клетки, клетки экстраэмбриональной эндодермы и фибробласты. Основываясь на идентифицированных участках, общих для всех трех типов клеток, диссертант предложил схему организации репликации в исследуемом локусе. В качестве дополнительного метода, позволяющего локализовать как активные, так и неактивные ориджины репликации, была использована иммунопреципитация с антителами к белку ORC4 — одному из компонентов предрепликационного комплекса, который собирается на ориджине, с последующим анализом методом ПЦР в реальном времени. Эти эксперименты были проведены в фибробластах и выявили высокую степень перекрытия идентифицированных участков связывания комплекса ORC и районов раннего синтеза ДНК. Комбинация двух методов позволяет с высокой степенью надежности утверждать, что найденные локусы действительно представляют собой ориджины репликации. Некоторым недочетом работы — или, возможно, указанием направления дальнейших исследований — можно считать то, что она выполнялась на несинхронизированных культурах клеток. Диссертант аргументирует это тем, что асинхронность культур позволяет получить информацию об ориджинах, активирующихся в разных временных точках S-фазы, однако синхронизация культур с

отбором образцов в разных временных точках позволила бы получить такую же информацию, и к тому же данные о порядке активации ориджингов.

Известная последовательность локуса инактивации X-хромосомы *M. levis* позволила автору проанализировать нуклеотидный состав районов ориджингов и выявить их обогащение трактами poly(dA)•poly(dT), которые препятствуют формированию нуклеосом, и отсутствие ассоциации с G4-мотивами, формирующими квадруплексы, которые рядом авторов считаются необходимыми элементами ориджингов. Следует отметить, что этот анализ был проделан диссертантом с привлечением современных статистических методов.

Следующая крупная часть работы посвящена ассоциации исследуемых ориджингов репликации с модифицированными беками хроматина и транскрипционным статусом генов в локусе инактивации X-хромосомы. Автором показано отсутствие связи между активностью ориджингов и уровня транскрипции окружающих их генов. Значительно более интересные результаты были получены при исследовании распределения модифицированных форм гистоновых белков. Было обнаружено, что в районе максимально активного ориджина в промоторе и первом экзоне гена *Xist* располагается участок с минимальной плотностью гистона H3, отражающего общее содержание нуклеосом, и высоким содержанием его варианта H3.3. Также для области этого ориджина было характерно наличие ацетилированной формы гистона H3K9 и низкий уровень метилированных форм гистонов H3K27me3 и H4K20me1. Возможно, данные модификации имеют отношение прежде всего к регуляции транскрипционной активности генов, окружающих ориджин, однако сопутствующие изменения доступности хроматина влияют и на эффективность использования ориджина. Функциональная связь между наличием модифицированных форм гистонов и эффективностью инициации репликации также может служить предметом дальнейших исследований.

Наконец, диссертант делает попытку сравнить расположение ориджингов репликации в центре инактивации X-хромосомы *M. levis* и *M. musculus*. Несмотря на различия в геномной структуре локуса у этих видов, в обоих случаях удается идентифицировать ориджинны, ассоциированные с генами *Enox*, *Xist* и *Tsix*. Однако выявляются и видоспецифичные ориджинны. К сожалению, диссертант здесь упускает возможность обсудить привязку ориджингов к другим функциональным элементам центра инактивации X-хромосомы, которые у *M. musculus* выявлены в результате исследований группы «The Mouse ENCODE Consortium», что значительно усилило бы данную часть работы.

В разделе «Заключение» диссертант суммирует итоги работы. Эта часть в основном повторяет следующий за ней раздел «Выводы», и могла бы быть значительно расширена. Как минимум в ней хотелось бы видеть перспективы развития данного исследования.

В ходе работы диссертантом выявлены и охарактеризованы ориджины репликации в центре инактивации X-хромосомы у самцов полевки *M. levis*. Выявлено расположение активных ориджинов репликации в данном локусе для трофобластных стволовых клеток, клеток экстраэмбриональной эндодермы и фибробластов. Определена локализация сайтов связывания комплекса распознавания ориджинов (ORC) и проведен анализ нуклеотидного состава этих районов. Изучено распределение гистона H3, его варианта H3.3, ацетилизованного гистона H3K9, метилизованного гистона H4K20 и триметилизованного гистона H3K27. Проведен сравнительный анализ расположения и активности ориджинов в центре инактивации X-хромосомы *M. levis* и *M. musculus*. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

Диссертация написана правильным русским языком, хотя в некоторых местах встречаются ошибки и опечатки. Можно выдвинуть несколько замечаний по оформлению работы. Например, вряд ли имеет смысл включать в список сокращений принятые в международной номенклатуре и общеупотребительные сокращения (ДНК, РНК), а сокращение TTR дано только с расшифровкой на английском языке без перевода на русский. В разделе «Экспериментальная часть» при описании реакций ПЦР даются объемы и концентрации смешиваемых реагентов, а не их конечные концентрации в реакционной смеси. Упорядоченный по алфавиту список литературы, на который идут ссылки по фамилии первого автора, не должен нумероваться.

Сделанные замечания по содержанию и оформлению работы не умаляют ее достоинств и не влияют на выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Шерстюка В. В. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данному вопросу.

Работа Шерстюка В. В. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача картирования и характеристики ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы восточноевропейской полевки *Microtus levis*, имеющая существенное значение для важнейшего направления молекулярной и клеточной биологии — изучения механизмов репликации генома эукариот.

Результаты работы отражены в публикациях в журналах «PLoS ONE» (2012 г.), «Доклады Академии наук» (2013 г.), «Chromosoma» (2014 г.), а также в материалах XLIX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011 г.) и Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, 2013 г.)

Все вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа Шерстюка Владимира Владимировича является законченным исследованием, которое по своему объему, актуальности новизне полученных результатов и их научной значимости соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», а ее автор Шерстюк В. В. заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Руководитель группы взаимодействий биополимеров  
ИХБФМ СО РАН, д. б. н., доцент

Жарков Д. О.

630090, Новосибирск  
пр-т Академика Лаврентьева, д. 8  
Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН  
тел. +7-383-363-51-28  
dzharkov@niboch.nsc.ru



Подпись Жаркова Д. О. заверяю  
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к. х. н.

Пестряков П. Е.

30 апреля 2015 г.