

**Отзыв официального оппонента на диссертационную работу
Остромышенского Дмитрия Игоревича «Состав хромоцентров мыши *in silico*
и их основной компонент, tandemные повторы, у мышевидных грызунов»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология**

Актуальность темы исследования

Примечательная особенность геномов эукариотических организмов – наличие большого числа повторяющихся последовательностей ДНК. Рассеянные по геному (диспергированные) повторяющиеся последовательности представляют собой мобильные генетические элементы: LINE, SINE, LTR-содержащие элементы и ДНК-транспозоны. Они не только вызывают инсерционные мутации, но некоторые их копии вовлечены в нормальную регуляцию экспрессии генов. Тандемные повторяющиеся последовательности (сателлитная ДНК) были открыты в 70-е годы прошлого века. Они описаны для целого ряда геномов. Выяснилось, что сателлитная ДНК локализуется в конститутивном гетерохроматине центромерных районов хромосом. В течение довольно длительного времени интерес к этим последовательностям ДНК был умеренный, так как предполагали, основываясь на их чрезвычайно быстрых изменениях в эволюции, что они нефункциональны и представляют собой «мусорную» ДНК. Однако в последние годы интерес к тандемным повторам ДНК сильно возрос, поскольку стали накапливаться свидетельства того, что они играют роль в таких важных процессах как митоз и мейоз; кроме того конститутивный гетерохроматин, видимо, вовлечен в процесс поддержания пространственной организации генетического материала в ядре. И все же структура ДНК центромер и соседних областей хромосом (перичентромер), остается мало изученной. В значительной мере это связано с тем, что сборка таких областей при секвенировании геномов до настоящего времени остается не решенной проблемой именно из-за тандемной повторяемости последовательностей, их образующих. Диссертационная работа Д.И. Остромышенского как раз посвящена изучению ДНК центромерных и перичентромерных областей хромосом домового мыши – основного модельного объекта среди млекопитающих.

Цели и задачи исследования

Цель своей работы Д.И. Остромышенский сформулировал следующим образом: определение состава конститутивного гетерохроматина домовой мыши и основных компонентов, входящих в его состав и выяснение некоторых аспектов эволюции главного компонента гетерохроматина — tandemных повторов.

Для достижения этой цели автором диссертации были определены три основные задачи:

1. Выделение, высокопроизводительное секвенирование и анализ ДНК хромоцентров домовой мыши. Анализ распределения найденных последовательностей в доступных сборках генома мыши.
2. Проверка полученных *in silico* данных молекулярно-биологическими методами (гибридизация *in situ*).
3. Анализ распределения и эволюции tandemных повторов в геномах мышевидных грызунов.

Положения, выносимые на защиту, в полном объеме представляют решаемую автором проблему.

Новизна и значимость работы

Диссертантом впервые проведено высокопроизводительное секвенирование и анализ состава ДНК хромоцентров мыши. Показано сильное обогащение ДНК хромоцентров и, соответственно, гетерохроматина tandemными повторами. С помощью биоинформатических и молекулярно-биологических подходов показана обогащенность гетерохроматина мыши 3'-концевым фрагментом LINE1 длиной около 2000 п.н. Обнаружено, что сходная картина наблюдается и в сборках центромерных районов генома человека. В ДНК хромоцентров мыши найдено большое число участков LTR-содержащих ретротранспозонов, представляющих собой эндогенные ретровирусы (ERV). Среди них наиболее богато представлены в ДНК хромоцентров ретроэлементы интрацистернальных А-частиц (IAP) и их LTR. Высказано предположение о том, что некоторые из фрагментов ERV могут содержать промоторы, благодаря которым инициируется транскрипция ТП.

Д.И. Остромышенский нашел и аннотировал большое число новых tandemных повторов в геномах домовой мыши *Mus musculus*, а также *Mus caroli*,

сирийского (*Mesocricetus auratus*) и китайского (*Cricetulus griseus*) хомячков. С помощью гибридизации *in situ* он показал их локализацию в перицентромерных районах определенных хромосом. Сделаны выводы о характере эволюции tandemных повторяющихся последовательностей в геномах мышевидных грызунов. Аннотирование новых tandemных повторов позволит глубже исследовать транскрипты и их роль в эмбриогенезе и канцерогенезе, а также будет способствовать изучению функциональной роли этого типа последовательностей ДНК в формировании пространственной структуры генетического материала и в регуляции при помощи lncRNA (long non-coding RNA, длинная некодирующая РНК).

Таким образом, все полученные диссертантом данные оригинальны и значимы.

Общая характеристика работы

Диссертация Д.И. Остромышенского построена по стандартному образцу, т.е. состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы и Список цитируемой литературы, включающий 159 источников. Диссертация изложена на 114 страницах, содержит 9 таблиц, 17 рисунков и 5 приложений.

Во введении ясно изложены цели исследования, отражены основные достижения автора и его вклад в работу. Обзор литературы написан правильным ясным научным языком и освещает современное состояние науки в области диссертационного исследования. Автор затрагивает в обзоре следующие вопросы: гетерохроматин и хромоцентры; диспергированные повторы; tandemные повторы (ТП) и их эволюция; транскрипция ТП; ТП в геномах мышевидных грызунов. В главе «Материалы и методы» описан широкий спектр молекулярно-биологических методов, использованных автором при выполнении диссертационной работы. Основными подходами в данном исследовании были секвенирование ДНК хромоцентров, биоинформационный анализ полученных данных и баз данных и, наконец, флуоресцентная гибридизация хромосом *in situ* (FISH). Методы, за некоторым исключением (см. критические замечания), описаны достаточно подробно и ясно.

Результаты описаны, главным образом, достаточно подробно. Они вполне убедительны. Автор диссертации хорошо владеет биоинформационными методами, что сыграло немалую роль в выполнении данного исследования. Очень

хорошо выглядят результаты гибридизации *in situ* – видно, что ее проводил опытный и искусный экспериментатор. Обсуждение результатов читается с интересом – автор сопоставляет свои результаты с данными большого числа публикаций других исследователей. Выводы диссертации корректны и обоснованы, они вполне соответствуют поставленным в работе задачам. Автореферат достаточно хорошо отражает содержание и выводы работы, хотя большее число иллюстраций могло бы его дополнительно улучшить.

По результатам данной диссертации опубликовано 9 статей в рецензируемых международных (3) и отечественных (6) журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ, а также 8 тезисов докладов конференций. Таким образом, диссертация Д.И. Остромышенского соответствует требованиям ВАК РФ по степени представленности результатов в печатных работах и апробации на конференциях.

Критические замечания

Рецензируемая работа Д.И. Остромышенского не лишена некоторых недостатков, которые, однако, не ставят под сомнение значимости результатов и сделанных выводов.

Обзор литературы несколько поверхностный и излишне краткий (15 стр.). В нем очень не хватает иллюстраций. Несколько схем, иллюстрирующих, например, строение хромоцентров или гипотезы эволюции tandemных повторов и т.д., были бы очень полезны. В разделе «1.5. ТП мышевидных грызунов» следовало обсудить ТП крысы и полевок, а, возможно, и других мышевидных грызунов, не упомянутых автором диссертации. (PMID некоторых статей про ТП полевок: 1611217, 11234379, 8375217, 11605531, 11903559, 9785562, 9872664, 11993932, 20830505, 16897458, 8995489, 19372666, 25402553, 21042006).

Раздел «Материалы и методы» в целом написан неплохо. Однако почему-то не приводится методика выделения хромоцентров (пункт 2.1.1.). Это важная, специфическая, малоизвестная методика и ее, конечно, следовало описать в диссертации. Не описано получение ДНК хромоцентров с использованием набора Nextera. Диссертация должна предоставлять читателю всю необходимую для ее понимания и оценки информацию.

В этом разделе автор диссертации многократно использует слово «проба» вместо «зонд» (см., раздел 2.2.8.). Проба – это образец для анализа, а не то, чем осуществляют детекцию, в том числе, гибридизационную.

На стр. 38 читаем: «Реакционная смесь содержала буфер для Taq-полимеразы (50мМ $MgCl_2$)...» Реакционная смесь для ПЦР не может содержать хлорид магния в такой высокой концентрации.

Результаты

На стр. 42 отмечено, что «на метафазных хромосомах мышинных эмбриональных фибробластов зонд к ДНК хромоцентров дает сигнал в ЦЕН/периЦЕН районе всех хромосом, кроме, возможно, половых (Рисунок 1, III).» Остается не вполне понятным, почему может отсутствовать сигнал на половых хромосомах.

На стр. 55 написано: «В отличие от ERV, покрытие LINE ридами ChrmC сильно неравномерно с несколькими пиками и значительно большим покрытием в ~2 т.п.н. области 3' конца 2-го ORF и 3'-UTR (Рисунок 7, синяя линия)». На мой взгляд, на рисунке 4 у ERV пики, столь же выраженные как у LINE1 на рисунке 7. Да, действительно покрытие 3'-концевой области LINE1 заметно большее, чем 5'-области. Хорошо известно (см. например, обзор PMID: 26104698), что в геноме значительно чаще встречаются копии LINE1, образованные только 3'-концевыми последовательностями (красный график на рис. 7 хорошо с этим согласуется). Это связано с тем, что, порождающая новые копии LINE, обратная транскрипция в клетке начинается на 3'-конце РНК LINE1 и редко может достигнуть её 5'-конца. Благодаря этому в геноме значительно чаще встречаются 3'-концевые последовательности LINE1, чем 5'-концевые. К сожалению, об этом в диссертации ничего не написано.

Стр. 64. В подписи к рисунку 14 нет объяснения того, что представлено в нижнем ряду панели I. На этих микрофотографиях нет никаких гибридизационных сигналов и можно предположить, что они иллюстрируют морфологию хромоцентров. Однако на других рисунках с FISH интерфазных ядер автор не дает аналогичных контрольных фотографий.

Стр. 69. В разделе «3.9. ТП у разных родов мышевидных грызунов» говорится о гибридизации метафазных хромосом трех родов мышей (*Mus*, *Apodemus* и *Sylviaemus*) с диссекционной центромерной пробой *M. musculus*. К сожалению, ни один из результатов этих опытов не представлен в диссертации. То же самое относится к FISH с зондами *ChipA M. musculus* и *ChipA Apodemus peninsulae*. Кроме того, в диссертации не говорится, с чем проводили FISH в этих опытах – с клетками костного мозга или с культурами клеток. В любом случае в

диссертации (в «Материалах и методах») следовало написать, откуда были получены животные или культуры клеток и как эти клетки называются.

Стр. 74. «*In silico* и *in situ* показано, что если у даже достаточно близкородственных мышей (*M. musculus* и *M. caroli*) сходными оказываются только несколько ТП, а большинство других ТП не встречаются у другого вида.» В этой фразе – явные дефекты.

Обсуждение результатов

На стр. 80 написано: «Несмотря на огромное разнообразие в нуклеотидных последовательностях между видами, центромерные ТП обычно характеризуются мономерами с длиной, примерно соответствующей размеру нуклеосомной ДНК (около 170 п.н.)». Странно, что столь важный вопрос не затронут и не разобран в обзоре литературы. Ссылок также не приведено.

На стр. 80 читаем: «Высокое количество ~2 т.п.н. фрагмента LINE в конститутивном гетерохроматине обеспечивает решение парадокса FISH: гибридизация *in situ* не может распознавать полноразмерный LINE в гетерохроматине (их очень мало), но фрагмент LINE дает сильный сигнал именно в гетерохроматине». Высокого количества не бывает. Можно - большое количество. «Парадокс FISH и его решение» надо было описать более развернуто. То как это сейчас написано - малопонятно. Еще надо отметить, что гибридизация клона C25, соответствующего участку из 5'-концевой половины LINE 1, также наблюдается только в области ЦЕН/периЦЕН (Рис. 10). Почему нет гибридизационных сигналов на плечах хромосом?

Стр. 83. «4.4. Сложная организации хромоцентров мыши». Этот довольно значительный по объему раздел трудно признать за обсуждение результатов. Лишь в его последней фразе упоминаются результаты диссертанта; все остальное выглядит как Обзор литературы.

Сделанные замечания касаются лишь формы подачи материала, а не сути полученных результатов и сделанных выводов, поэтому они не могут существенно снизить высокой оценки данной диссертационной работы.

Заключение

Диссертация Остромышенского Д.И. на тему «Состав хромоцентров мыши *in silico* и их основной компонент, тандемные повторы, у мышевидных грызунов», выполнена на высоком методическом уровне, представляет собой законченную, целостную, научно-квалификационную работу. В ходе ее выполнения получены

новые, интересные и важные данные в области строения генома и хромосом высших организмов. Диссертационная работа Д.И. Остромышенского, выполненная под руководством профессора Ольги Игоревны Подгорной, полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения научных степеней» (утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Крамеров Дмитрий Александрович,
профессор, доктор биологических наук
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология,
заведующий Лабораторией эволюции геномов эукариот
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии
наук (ИМБ РАН)
Адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН
Телефон: +7-499-135-99-97
e-mail: kramеров@eimb.ru

15.06.2018

Подпись Крамеров Д.А. удостоверено
участком секретаря ИМБ РАН
Бочаров А.А.

