

ОТЗЫВ

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

Представляемая к защите диссертация Д.И. Остромышенского посвящена актуальной теме – исследованию молекулярной композиции конститутивного гетерохроматина доменной мышцы и гетерохроматина нескольких видов грызунов сем. Muridae из круга её родства.

Районы конститутивного гетерохроматина, их организация, их роль в функционировании генома и в реализации программ развития эукариот вот уже 90 лет остаются в центре внимания цитологов, генетиков и молекулярных биологов. Результаты полногеномного секвенирования геномов эукариот значительно расширили и углубили наши знания о структурной и функциональной организации генома эукариот, однако именно районы конститутивного гетерохроматина, вследствие того, что они насыщены многократно повторенными, относительно короткими tandemными повторами, до сих пор остаются *terra incognita* на фоне относительно хорошо изученного эухроматина. В полной мере это относится и к гетерохроматину домашней мышцы и других мышевидных грызунов.

Несомненно, геном мышей *Mus musculus* неоднократно изучался с использованием самых разных подходов, как геномных, так и цитогенетических. Исследовалась при этом и молекулярная композиция перичентромерного конститутивного гетерохроматина мышей. Эти исследования показали, что фракция tandemных повторов (ТП) в геноме мышцы значительно менее разнообразна, чем в геномах других позвоночных, например, человека (Pietras et al., 1983; Elder, Turner, 1995 и многие другие). Принято считать, что в геноме *M. musculus* расположенные в центромерном районе монотонные кластеры минорного сателлита окружены монотонными полями мажорного сателлита. Длительное время казалось, что это твердо установленный факт, впервые продемонстрированный около 35 лет назад и с тех пор неоднократно подтвержденный с использованием разных методов молекулярной цитогенетики. Однако, как показали работы О.И. Подгорной и сотрудников, работы лаборатории, в которой выполнена защищаемая сегодня работа, tandemные повторы в геноме мышей значительно более разнообразны, мир tandemных повторов в эукариотическом геноме в целом, по-видимому, устроен значительно сложнее, интереснее и, если угодно, таинственнее.

Сотрудниками О.И. Подгорной недавно был проведен тщательный анализ секвенированных геномов мышей и было показано, что в геноме мышей присутствует еще несколько семейств tandemных повторов, каким-то образом

распределенных по геному (Komissarov et al., 2011 и др.). Естественно, что предсказания, полученные методами биоинформатики, нуждались в экспериментальной проверке, вновь открытые tandemные повторы в геномах мышей нужно было картировать *in situ*, важно было определять, присутствуют ли эти новые семейства tandemных повторов в геномах других видов рода *Mus*, где они расположены в геноме, какое место занимают в интерфазном ядре. Актуальность всех этих вопросов, их новизна и общенаучная значимость не вызывают никаких сомнений.

Представленная к защите диссертационная работа изложена на 113 страницах формата А4, построена по традиционному плану: содержательная часть работы состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», 5 приложений.

Во «Введении» диссертант формулирует цель работы и рассказывает о задачах, которые были перед ним поставлены.

Объявленная цель работы представленной к защите диссертационной работы Д.И. Остромышенского – используя сочетание методов биоинформатики и молекулярной цитогенетики определить состав конститутивного гетерохроматина *Mus musculus*, выяснить последовательности каких семейств входят в состав хромоцентров и блоков конститутивного гетерохроматина в хромосомном наборе мыши, после чего, проведя сравнительный анализ повторяющихся последовательностей, обнаруживаемых в геномах другого вида мышей *M. caroli*, и двух видов хомяков *Cricetulus griseus* и *Mesocricetus auratus*, выявить основные пути и тенденции в эволюции tandemных повторов и транспозонов, представленных в хромоцентрах грызунов.

Для выполнения этой цели диссертант поставил перед собой следующие задачи:

1. Выделить, секвенировать и проанализировать ДНК хромоцентров домовый мыши.
2. Провести скрининг имеющихся сборок геномов мыши и выделить в этих «сборках» последовательности, ассоциированные с tandemными повторами.
3. С помощью физического картирования повторов методом FISH определить местоположение в хромосомных наборах мышей последовательностей, ассоциированных с tandemными повторами в «сборках» геномов.
4. Сравнить молекулярную композицию хромоцентров/ конститутивного гетерохроматина *Mus musculus* с набором повторов разных семейств в геномах *M. caroli*, и двух видов хомяков *Cricetulus griseus* и *Mesocricetus auratus*, сделав выводы о распределении и эволюции tandemных повторов в геномах мышевидных грызунов.

Очевидно, что задачи, которые поставил перед собой диссертант, вполне соответствуют заявленной цели исследования. Актуальность и обоснованность поставленной задачи и целей исследования не вызывают у меня никаких сомнений.

Обзор литературы в рассматриваемой диссертации очень небольшой по объему – всего 14 страниц. Я бы не назвал его самой значимой, имеющей самостоятельное значение частью диссертационной работы, но, в тоже время, надо признать, что в обзоре содержится краткое описание основных работ, в которых изучалась молекулярная композиция гетерохроматина, обзор содержит основные сведения, касающиеся проблемы транскрипции tandemных повторов и возможной роли tandemных повторов и транспозонов в эволюции. Мне кажется, что у диссертанта первоначально была мысль включить в обзор главу «Тандемные последовательности в геноме мыши» – это следует из начала главы 1.5 обзора: «Тандемные повторы других представителей рода *Mus* исследованы еще меньше, чем тандемные повторы *M. musculus*...» – но главы «Тандемные повторы в геноме *Mus musculus*» в Обзоре литературы нет. С моей точки зрения, не была бы лишней в Обзоре литературы и глава о филогенетических отношениях и о времени дивергенции видов рода *Mus* и хомяков *Cricetulus griseus* и *Mesocricetus auratus*, поскольку одна из задач работы – изучение эволюции состава хромоцентров и tandemных повторов в геномах мышевидных грызунов.

Раздел Материал и Методы и глава Результаты показывают, что Д.И. Остромышенский владеет разнообразными методами современной молекулярной цитогенетики (в том числе и вполне оригинальными), и методами биоинформатики. Подчеркну, что в работе использовалась не только «рутинная» FISH с обычными двухцепочечными пробами (метод, вообще-то, довольно сложный), но и успешно проведена гибридизация с одноцепочечными олиго-пробами, которые были разработаны диссертантом, а задача эта несравненно более трудная, где кроме умения работать, требуется еще и талант и удача, талантам иногда сопутствующая.

Единственное замечание по разделу «Материалы и методы» – излишне краткое изложение использованного метода фракционирования структур ядра для того, чтобы можно было выделить ДНК хромоцентров. Между тем, это один из ключевых этапов в работе. От того, что именно выделяется после фракционирования содержания ядра по методу Прусова и соавт. зависят едва ли не все результаты. К тому же, метод выделения хромоцентров, предложенный Прусовым, значительно менее известен, чем подробно расписанный в диссертации метод получения препаратов митотических хромосом из клеток костного мозга.

Полученные результаты иллюстрированы микрофотографиями высокого качества, квалифицировано и интересно обсуждены. Список цитируемых источников еще раз показывает, что диссертант хорошо образован,

что квалификация его как цитолога и молекулярного биолога не может вызывать сомнения.

Теоретическая и практическая значимость проведенного исследования:

Полученные диссертантом данные заметно дополняют имеющиеся представления о молекулярной организации гетерохроматина и о путях эволюции входящих в его состав повторенных последовательностей. Научная новизна проведенного исследования очевидна. Диссертант секвенировал с использованием технологии Illumina и детально проанализировал последовательности ДНК хромоцентров мыши. На этом этапе работы было показано сильное обогащение ДНК хромоцентров tandemными повторами, фрагментами транспозонов LINE и ERV. Среди ERV были наиболее представлены транспозоны IAP, в частности их LTR. Это важное и интересное открытие, поскольку есть основания думать, что найденные фрагменты ERV могут оказаться сильными промоторами транскрипции tandemных повторов гетерохроматина. Диссертант показал, что существенным элементом конститутивного гетерохроматина мыши является фрагмент 3'-конца ORF2 и 3'-некодирующего региона LINE длиной ~2 т.п.н. и что полноразмерные LINE в конститутивном гетерохроматине мышей, по-видимому, отсутствуют. На конкретных примерах им показано, что в ходе дивергенции видов и родов мышевидных грызунов происходит быстрая эволюция tandemных повторов. Им показано, что большинство семейств tandemных повторов видоспецифичны или встречаются только у очень близких видов. В работе отработаны и опробованы несколько новых экспериментальных подходов, которые могут быть полезны для исследования организации кластеров tandemных повторов у других эукариот.

Все полученные результаты подробно изложены в главе «Результаты» и грамотно обсуждены. Особо надо отметить высокое качество и большое число микрофотографий, убедительно показывающее, что диссертант не только умеет работать с хромосомами, но и обладает в этой области определенным талантом.

После знакомства с текстом диссертации, для меня остались неясными несколько вопросов:

1. При разделении компонентов ядра по методу, предложенному Прусовым и соавт. (Prusov et al., 2002), в оригинальном исследовании Прусова и соавт. хромоцентры разделялись на две фракции. С какой фракцией хромоцентров работал диссертант?
2. 48 лет назад Yasmineh и Yunis (Yasmineh W.G., Yunis J.J. Localization of mouse satellite dna in constitutive heterochromatin //Experimental Cell Res. 59 (1970): 69-75) попытались определить, какая доля tandemных повторов генома мышей в интерфазе включена в хромоцентры (авторы называли фракцию «конститутивный гетерохроматин») – по

их расчетам – 70% сат-ДНК лежит в «гетерохроматине»/хромосомах. Можно ли рассчитать, какая доля генома попадает во фракцию «хромосомы», выделенную по методу Прусова и соавт., и какую часть ее составляют tandemные повторы и транспозоны?

3. В тексте работы диссертант, ссылаясь на работу Solovei et al. (2009), пишет, что при FISH «зонды к ORF L1 не гибридизуются с районами гетерохроматина мыши (Solovei et al., 2009)». Это важная и интересная информация, существенная при обсуждении результатов, полученных диссертантом, однако в списке литературы в диссертации я не нахожу работы Соловей и соавт. 2009 года, а в известной мне работе И.В. Соловей 2009 года нет таких данных (Solovei et al. Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution // Cell (2009) 137: 356–368). В какой статье Соловей это было показано?
4. Диссертантом показано, что в хромосомах у мышей представлены, в основном, не полноразмерные последовательности LINE1-транспозона, а только часть (~2 т.п.н.) фрагмента 3'-конца ORF2 и 3'-некодирующий район LINE1. Но, насколько известно, ORF2 кодирует протеин(ы) с несколькими функциями, среди которых реверс-транскриптаза и эндонуклеаза. Известно ли, какая функция у того участка ORF2, который лежит на 3'-конце ORF2, насколько он консервативен и какую роль в жизненном цикле транспозона играет 3'-нетранскрибируемый район LINE1? Не связано ли сохранение 3'-концов LINE1 в гетерохроматине с тем, что эти районы нужны для выполнения какой-то функции в гетерохроматине помимо транспозиций LINE1?

Результаты представленной к защите работы Д.И. Остромышенского могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов, специализирующихся на кафедрах генетики и биотехнологии, цитологии, клеточной биологии, биохимии, молекулярной биологии.

Текст диссертации написан хорошим языком, ясно и просто.

Результаты диссертационного исследования Д.И. Остромышенского опубликованы в 18 печатных работах, среди них 9 статей в рецензируемых изданиях из «перечня ВАК». Среди них такие авторитетные издания, как ВМС

Genomics, Chromosome Research, Research Journal of Zoology, Цитология (Cell and Tissue Biology). Результаты и выводы из работы неоднократно обсуждались на представительных отечественных и международных конференциях.

Положения, выносимые на защиту и выводы из работы, обоснованы полученным материалом и представляются достоверными.

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Тем самым, кандидатская диссертация Д.И. Остромышенского «Состав хромоцентров мыши *in silico* и их основной компонент, тандемные повторы, у мышевидных грызунов» соответствует критериям, установленным в «Положении о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор ее заслуживает присвоения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Доктор биологических наук,
заведующий лабораторией биосистематики
и цитологии БИН РАН, профессор



Александр Викентьевич Родионов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН)

197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, дом 2, тел./факс +7
(812) 372-54-43

avrodionov@mail.ru

09.06.2018

Подпись руки *Родионова А.В.*
ЗАВЕРЯЮ *Игорь Владимирович*
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

