

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ахметовой Катаринны Артемовны “Роль белка Peanut и его функциональных доменов в клеточных процессах у *Drosophila melanogaster*”, представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

В настоящее время использование современных технологий и новых методов исследования привело к бурному развитию такого важного раздела биологии как клеточная биология. Данные, полученные в этой области, имеют фундаментальное значение для понимания общих процессов, лежащих в основе жизнедеятельности разных типов клеток

Недавно были открыты структурные клеточные белки септины, которые представляют собой группу консервативных ГТФ-фазных белков. Они способны собираться в гетеро-олигомерные комплексы, а затем полимеризоваться в протяженные филаменты для выполнения своих клеточных функций. Филаментная организация септинов, а также их взаимодействие с клеточной мембраной послужили поводом рассматривать их как четвертую составляющую цитоскелета, наряду с актином, микротрубочками и промежуточными филаментами. Участие септиновых филаментов в таких клеточных процессах как цитокinesis, установлении клеточной полярности, клеточном движении, везикулярном транспорте, экзоцитозе, апоптозе и нейрогенезе обусловлено возможностью служить площадкой для привлечения определенных белков или служить барьером для проникновения других белков, обеспечивая компартментализацию процессов в обособленном районе на клеточной мембране. В настоящее время обнаружена связь между мутациями в септиновых генах и различными заболеваниями у человека (разные типы рака, нейродегенеративные нарушения, мужская стерильность и т.д.). Принимая во внимание участие этих белков в важных клеточных процессах как, а также динамичность процессов сборки и разборки филаментов, **актуальным** на сегодняшний день являются исследования тонких механизмов филаментообразования. Так как септины характеризуются схожей доменной структурой у разных видов, то изучение их характеристик на таком модельном объекте как *Drosophila melanogaster* может способствовать эффективному решению многих вопросов.

Диссертант выбрала именно этот объект, который на сегодняшний день наиболее хорошо изучен согласно молекулярно-генетическим данным. Септиновый комплекс

дрозофилы гомологичен хорошо изученному гетеромерному комплексу человека. Он состоит из трех септиновых белков, соединенных в последовательности Peanut- Sep2- Sep1- Sep1 Sep2- Peanut. Белок Peanut располагается по краям комплекса и важен как для образования комплексов, так и филаментов. Кроме того, известно, что белок Orc6, участвующий в репликации, как-то взаимодействует с С-концевым доменом белка Peanut, что стимулирует полимеризацию. Возникает вопрос о роли функциональных доменов белка Peanut, в частности ГТФ-ного и С-концевого, в процессах сборки. Ранее для этого гена был получен нуль-аллель, который вызывал нарушение цитокинеза у гомозиготных мух. Однако, учитывая многообразие процессов, в которых может участвовать септиновый комплекс, представляется актуальным более подробно исследовать влияние гена *peanut* на процессы деления и дифференцировки в разных клеточных типах на организменном уровне.

В целом, возможность участия септинов в важных клеточных процессах и данные о нарушениях в септинах при тяжелых заболеваниях у человека, а также важность осуществления септинами клеточных функций, определяет актуальность дальнейших исследований процессов, в которых они могут участвовать, и выяснения тонких механизмов филаментообразования.

Поэтому поставленная Ахметовой К.А. цель диссертационной работы - исследовать роль белка Peanut и его функциональных доменов в клеточных процессах у *Drosophila melanogaster* – **несомненно, является актуальной и востребованной для современной науки**, задачи исследования полностью соответствуют цели, а используемые методы адекватны.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнения. Многие важные результаты исследований Ахметовой К.А., действительно получены впервые. К наиболее значимым относятся, во-первых, получение уникальной плазмиды (pUASP-W) для подавления экспрессии генов в условиях РНК-интерференции как в генеративных, так и соматических клетках; во-вторых, обнаружение, что пониженный уровень экспрессии гена *peanut* приводит к нарушению подвижности сперматозоидов; в-третьих, на модели оогенеза дрозofilы показано функционирование *peanut* в соматических клетках, входящих в состав яичников, которые отвечают за поляризацию яйцевых камер, в-четвертых, показана важность целостности функциональных доменов гена *peanut* для функционирования септиновых филаментов и, следовательно, для выживания мух. Также впервые при помощи электронной микроскопии показано, что репликационный белок Orc6 непосредственно связывается с септиновыми комплексами в соотношении 2

молекулы Ogc6 на один комплекс и стимулирует их полимеризацию. Все это углубляет наши знания о процессах деления и специализации клеток.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты диссертационной работы Ахметовой К.А. важны для дальнейших исследований в области пролиферации соматических и генеративных тканей, особенно в репродуктивных системах, состоящих из двух типов клеток. Исследования нарушений сперматогенеза при подавлении экспрессии гена *peanut* у дрозофилы подтверждают роль септинов в этом процессе. Интересно, что и у человека нарушения в гене *sept7*, гомолога гена *peanut*, вызывают мужскую стерильность. Заслуживает внимания факт, что чувствительными к уровню белка Peanut являются генеративные клетки на самых ранних этапах сперматогенеза, а эффект проявляется на поздних стадиях, в ходе спермиогенеза. Эти данные клеточной биологии необходимо учитывать и в практической медицине. Полученные диссертантом данные о важности целостности функциональных доменов гена *peanut* углубляют наши знания о механизмах сборки септиновых филаментов, для которых важны как ГТФ-азные, так и С-концевые домены. В частности, подтверждена роль белка Ogc6, который непосредственно связывается с С-концевым доменом, в формировании септиновых филаментов. Эти результаты указывают на связь септинового белка Peanut с белком репликационного комплекса Ogc6, что открывает новые перспективы для дальнейших исследований связи между сигнальными путями репликации и цитокинеза на пути регуляции сборки септиновых филаментов. Результаты работы имеют также практическую ценность для исследователей - синтезирована плаزمида pUASP-W, используемая для проведения РНК-интерференции как в соматических, так и генеративных клетках.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И ОБОСНОВАННОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Автором самостоятельно были проведены и проанализированы основные эксперименты. Особенно хочется отметить цикл работ с привлечением новой плазмиды и проведение электронной микроскопии в исследованиях филаментообразования. В целом в работе было использовано более 20 различных методик, включая синтез генетических конструкций, иммунохимическое окрашивание органов, получение трансгенных линий мух, оценка экспрессии индивидуальных септиновых белков и т.д. Все исследования были проведены с привлечением современных молекулярных и цитогенетических методик. Результаты, полученные *in vitro* и *in vivo*, были сопоставлены и сравнены с имеющимися в литературе (если они были). Высокое качество приведенных в диссертации фотографий не

вызывает сомнений в результатах. В целом было проведено всестороннее комплексное исследование поэтому достоверность и обоснованность полученных автором результатов не вызывает сомнения.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертация написана в традиционном стиле и содержит 115 страниц машинописного текста, включая введение, список использованных сокращений, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, главы «Результаты», «Обсуждение», «Заключение» и «Выводы». Библиографический указатель состоит из 143 источника. Данные проиллюстрированы 12 таблицами и 31 рисунком.

Во «**Введении**» автор обоснованно представляет актуальность выбранного исследования, на основании чего формулирует цель и задачи исследования. Указывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

«**Обзор литературы**» представлен четырьмя подразделами и заключением. В целом автор проработал достаточно большой объем литературы, что позволяет в полной мере оценить современное состояние проблемы исследования.

«**Материалы и методы**» исследования подробно описывают более двадцати современных молекулярно-цитогенетических методик, использованных в работе. Методики адекватны поставленной цели и решаемым задачам.

В главе «**Результаты**» многочисленные эксперименты представлены пятью блоками, объединенными логикой исследования, что облегчает восприятие материала. Автор последовательно изучает роль септиных филаментов в процессах деления соматических и генеративных клеток в составе определенных органов, обращая внимание на локализацию на клеточной мембране, на особенности хромосомной сегрегации и на морфологические характеристики клеток. Исследования, проведенные на контрольных и мутантных линиях мух, позволили сделать вывод, что уменьшение продукта гена *peanut* не является критичным для деления генеративных клеток как в семенниках, так и яичниках дрозофилы, но приводит к аномалиям оогенеза за счет действия в соматических клетках, входящих в состав яичников, и нарушениям в спермиогенезе, вызывая неподвижность спермиев и стерильность самцов. У сперматозоидов стерильных самцов обнаружены морфологические дефекты в области базального тела. Далее автор исследует влияние конкретных мутантных изменений в двух функциональных доменах гена *peanut* – ГТФ-азного и С-концевого на распределение септинового комплекса в разных типах клеток и оценивает влияние этих нарушений на жизнеспособность мух. Важным выводом из этой серии работ является необходимость целостности доменов для правильной клеточной локализации и как следствие для нормальной жизнеспособности. Этот вывод

потребовал дальнейшего исследования важности целостности функциональных доменов гена на возможность формировать септиновые комплексы и филаменты. Для этих целей использовали 6 генетических конструкций с мутациями. В системе *in vitro*, используя сложные молекулярные методики, было показано формирование мутантных комплексов, которые не могли полимеризоваться – важная форма сборки септиновых комплексов для эффективного функционирования. Очень интересный блок работ включает исследования взаимодействия продуктов генов *peanut* и *orc6*, который показал, что белок Orc6 непосредственно связывается с Peanut, причем 2 молекулы Orc6 на септиновый комплекс, и стимулирует полимеризацию. У мутантных Peanut-белков такой эффект не обнаружен. В диссертации приведены прекрасные фотографии, подтверждающие факт связи.

Главы «Обсуждение» и «Заключение» написаны лаконично, но ёмко. Это позволяет ещё раз оценить важность экспериментов по результатам которых формулируются «Выводы». Всего 7 выводов, которые аргументированы и логически вытекают из анализа результатов выполненного научного исследования.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на перспективных российских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликованы 4 научные статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикаций результатов диссертационных исследований. Одна статья в известном иностранном журнале Mol. Biol. Cell, где Ахметова К.А. является первым автором. **Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации**

Принципиальных замечаний по содержанию работы у меня нет. Однако есть мелкие замечания и пожелания:

1. В диссертации на 29 стр. приведена таблица ассоциаций септинов человека с различными заболеваниями. Хотелось бы, чтобы каждый рассмотренный случай сопровождался соответствующей ссылкой на первоисточник.
2. Автореферат требует более тщательной проверки перед публикацией. Много опечаток, несогласований, иногда трудно понять, что хотел сказать автор (пример - 12 страница)
3. Пожелание. Анализ паттерна экспрессии гена *peanut* выявил присутствие его продукта в слюнной железе. Это секретирующий орган. Интересно посмотреть нарушена ли у мутантов секреция на фоне изменения локализации белка Peanut на клеточной мембране.

Мелкие недостатки, допущенные автором при оформлении диссертации, не повлияли на общее хорошее впечатление о данной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне и содержит результаты, без сомнения, представляющие интерес для исследователей в разных областях клеточной биологии. Совокупность электронно-микроскопических, молекулярно-биологических и генетических методов позволило автору связать изучение морфологии компонентов клеток с их биохимическими особенностями, установить их функциональное значение и определить генетические факторы, обеспечивающие эти процессы.

Представленная диссертационная работа “Роль белка Peanut и его функциональных доменов в клеточных процессах у *Drosophila melanogaster*”, “ по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте изложения материалов в рецензируемых научных изданиях полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским (п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» постановления Правительства №842РФ от 24.09.2013), а Ахметова К.А. достойна присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «генетика»

Официальный оппонент

Похолкова Галина Витальевна

Доктор биологических наук,

старший научный сотрудник

лаборатории молекулярной цитогенетики,

ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева 8/2

galina@mcb.nsc.ru

363-90-58

Ученый секретарь, к.б.н.

1 февр 2016



Похолкова Г.В.

Кокоза Е.Б.