

Отзыв

о диссертационной работе Баричевой Элины Михайловны на тему “Ген *Trithorax-like Drosophila melanogaster*, его экспрессия и роль в онтогенезе”, представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность темы исследований

В работе Баричевой Э.М. на примере дрозофилы как одного из наиболее изученных модельных объектов, рассмотрены вопросы, касающиеся механизмов генетической регуляции тканеспецифичности и органогенеза у многоклеточных организмов. Исследования такого рода находятся среди наиболее актуальных задач современной генетики развития. Это обусловлено прежде всего тем, что генетические программы регуляции развития тканей и органов часто являются эволюционно-консервативными и контролируются у широкого круга беспозвоночных и позвоночных животных сходными по составу системами генов. В этом контексте, представленное в работе Баричевой Э.М. всестороннее исследование гена *Trithorax-like (Trl)*, кодирующего транскрипционный фактор GAGA - один из ключевых факторов регуляции органогенеза дрозофилы, является весьма актуальным, поскольку позволяет более детально проанализировать сеть взаимосвязанных генов, участвующих в контроле развития дрозофилы. Актуальность исследования роли GAGA фактора обусловлена также тем, что этот белок является эволюционно-консервативным. Гомологи этого белка найдены у широкого круга как беспозвоночных, так и позвоночных организмов. Известно, что у разных видов гомологи белка GAGA связываются со схожими GA-богатыми последовательностями в регуляторных областях определенных генов. Однако данных о функционировании этих генов и кодируемых ими продуктов у других видов еще меньше, чем для дрозофилы. Поэтому детализация функционирования GAGA в конкретных процессах онтогенеза дрозофилы представляется весьма интересной и важной, поскольку может прояснить функции гомологов этого белка у других организмов. К тому же, данные, полученные на дрозофиле, могут быть использованы при исследовании развития органов и тканей у тех видов, для которых применение генетических и цитогенетических подходов на уровне целого организма по техническим или этическим причинам затруднено.

Высокая степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций обеспечивается:

1. обобщением и критическим анализом результатов большого числа ранее выполненных и современных научных работ в данной области исследований
2. комплексным применением классических и современных цитогенетических, биоинформационных и молекулярно-биологических методов исследования, адекватных цели и задачам работы;

3. репрезентативными размерами выборок, использованных для оценки влияния мутаций в генетических и цитологических исследованиях;
4. применением надежных методов статистической обработки полученных результатов;
5. хорошим знанием Интернет-ресурсов, баз данных и компьютерных программ, находящихся в свободном доступе.
6. публикацией основных результатов диссертации в международных и отечественных рецензируемых журналах, а также их широким обсуждением на российских и международных конференциях и симпозиумах.

Научная новизна исследований Баричевой Э.М. состоит в том, что

1. Получен уникальный набор мутаций, затрагивающих разные области гена *Trl* и снижающих в разной степени экспрессию гена. Использование этих и других мутаций позволило впервые на уровне целого организма исследовать регуляторный потенциал конкретных участков 5'-области и второго интрона этого гена. В результате, впервые были показаны особенности тканеспецифичной экспрессии гена *Trl* в ходе развития *D. melanogaster* и определена роль белка GAGA в процессах формирования разных органов на определенных этапах онтогенеза дрозофилы.

2. Впервые продемонстрировано, что уменьшение количества белка GAGA приводит к стерильности не только самок, но и самцов дрозофилы. Показано взаимодействие гена *Trl* с рядом генов, ключевых регуляторов развития, таких как *decapentaplegic*, *Delta*, *saxsophone*, в ходе развития половой системы самок - их экспрессия в яичниках дрозофилы изменяется на фоне уменьшения количества белка GAGA. Выявлен спектр нарушений, которые наблюдаются в ходе сперматогенеза у *Trl*-мутантов.

3. Впервые проведен всесторонний анализ изменения структуры глаза дрозофилы на фоне уменьшения количества белка GAGA. Выявлены гены, относящиеся к числу важнейших регуляторов процесса формирования глаза, активность которых зависит от уровня экспрессии гена *Trl*.

Достоверность представленных в диссертации результатов, выводов и рекомендаций обеспечивается:

1. четкой постановкой задач исследований;
2. хорошо продуманными и логично выстроенными экспериментами;
3. использованием методов исследований, адекватных цели и задачам работы;
4. корректным сочетанием количественного и качественного анализа полученных результатов и их всесторонним обсуждением.
5. значительным объемом экспериментальных данных, приведенных в 50 рисунках и 15 таблицах.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы определяются тем, что в ней:

1. содержатся новые знания о механизмах регуляции гена *Trl* дрозофилы на организменном уровне и функциональной роли продукта этого гена, белка GAGA, в онтогенезе и органогенезе данного организма;
2. показаны возможности использования мутаций в гене *Trl* для выяснения роли тех генов, которые участвуют в контроле таких эволюционно-консервативных процессов как оогенез, сперматогенез и развитие глаза. Полученные данные могут быть полезны при изучении аналогичных процессов у организмов, для которых подобные исследования затруднены из-за их биологических особенностей или в силу морально-этических проблем;
3. получены данные по выявлению новых генов, вызывающих стерильность самок и самцов дрозофилы, которые могут быть использованы в технологиях по обеспечению контроля численности насекомых, наносящих вред здоровью человека или снижающих продуктивность хозяйственных культур растений.

Анализ работы.

Структура диссертационной работы.

Диссертационная работа Э.М. Баричевой – объемный многолетний труд.

Материалы работы изложены на 218 машинописных страницах по традиционному плану, включающему разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, выводы и список цитированной литературы. Диссертация содержит 15 таблиц и 72 рисунка. Список цитируемой литературы включает 330 ссылок.

Введение написано в соответствии с требованиями ВАК РФ. В нем представлены все разделы, необходимые для общей характеристики работы. Четко обоснованы актуальность темы исследования, степень ее разработанности в мировой науке, сформулированы цель и задачи работы, положения, выносимые на защиту, методология исследований, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, и личный вклад соискателя.

Обзор литературы (Глава 1) представлен на 59 страницах и содержит достаточно полную и хорошо систематизированную подборку сведений по теме диссертации. В нем, кроме данных о структуре, экспрессии, роли гена *Trl* в регуляции активности генов через множественные взаимодействия с белками хроматина и участия в онтогенезе дрозофилы, приведены современные представления о формировании половой системы самок и самцов дрозофилы, а также о развитии ее глаза и участии в этих процессах белка GAGA. Особо хочется отметить большое внимание, уделяемое автором вопросам генетического контроля органогенеза дрозофилы и эволюционной консервативности данного процесса. Представленные сведения удачно подкреплены иллюстративным материалом, который значительно улучшает восприятие этого раздела. Обзор завершается кратким заключением, в котором рассмотрены оставшиеся нерешенными вопросы

и определены основные направления исследований работы. В целом, обзор литературы дает достаточно полное представление об области исследований, которых касается диссертация, позволяя критически анализировать полученные автором результаты и их обсуждение без привлечения дополнительных источников.

В разделе "Материалы и методы" (Глава 2) на 14 страницах дается описание реагентов, генетических линий мух и экспериментальных процедур, использованных в ходе выполнения работы. Следует отметить широкий спектр примененных подходов, особенно это касается цитогенетических и ряда современных молекулярных методов, что свидетельствует о высокой квалификации автора. Каждый из представленных методов достаточно подробно описан, что позволяет при необходимости воспроизвести проведенные эксперименты.

В Главе 3 (Результаты и обсуждение) автор логично и содержательно описывает проведенную работу и приводит сопоставление полученных результатов с ранее опубликованными данными. Глава состоит из 6 разделов. В первых трех разделах автором представлены оригинальные данные по экспрессии гена *Trl* в ходе развития *Drosophila melanogaster*, и выявлению участков, обеспечивающих специфичность его активности. В разделе 3.1 убедительно продемонстрировано, что в норме уровень активности и состав транскриптов гена *Trl* высокоспецифичны как для отдельных стадий развития, так и для разных органов и тканей дрозофилы. При этом основные транскрипты имеют длину 2,5 т.н. и 3 т.н. и кодируют белки GAGA-519 и GAGA-581, соответственно, однако представленность каждого из них сильно варьирует в зависимости от стадии развития или типа ткани. Поэтому совершенно логично, что в качестве следующего шага автором были проведены эксперименты по выяснению причин этого варьирования. Для этого в разделе 3.2 с помощью мутаций впервые детально исследовано влияние конкретных фрагментов 5'-области гена *Trl* на его экспрессию в контексте целого организма на разных стадиях развития и в отдельных органах и тканях. Показано, что изменения структуры этой области приводят к снижению жизнеспособности мух, к уменьшению фертильности и даже стерильности не только самок, но и самцов дрозофилы. Кроме того, было обнаружено, что на уровне организма и в культуре клеток один и тот же фрагмент в данной области может иметь разное влияние на экспрессию гена. Это позволило значительно расширить знания о регуляторном потенциале 5'-области гена. В разделе 3.3 автор подробно представил результаты анализа регуляторного потенциала второго интрона гена *Trl*. Для этого была проведена большая работа по получению и картированию делеций, затрагивающих данный интрон. Генетический и молекулярный анализ этих мутаций показал нахождение во втором интроне гена двух функционально значимых для его активности участков, обогащенных ДНКазой I -гиперчувствительными сайтами,

эволюционно-консервативными последовательностями ДНК и многочисленными сайтами связывания белка GAGA и других ТФ.

Таким образом, соискателю удалось убедительно показать и частично детализировать влияние конкретных фрагментов 5'-области и второго интрона гена *Trl* на его регуляцию (выводы 2-4) что, безусловно, является важным научным достижением.

В следующих разделах автором рассмотрены вопросы влияния недостатка белка GAGA на такие биологически важные процессы у дрозофилы как оогенез, сперматогенез и формирование глаз .

В разделе 3.4 представлены данные по изучению роли гена *Trl* в оогенезе. Для этого были использованы полученные в работе мутации, затрагивающие 5'-область гена, поскольку они вызывали особенно острые нарушения фертильности самок. В результате были обнаружены многочисленные нарушения в развитии яйцевой камеры на протяжении всего процесса оогенеза у всех исследованных *Trl*-мутантов, которые затрагивали: структуру и количество питающих клеток, а также структуру (конденсацию) хроматина в этих клетках; форму и расположение ооцита; функционирование разных типов фолликулярных клеток, включая бордюрные, центрипетальные клетки и дорзальные выросты хориона. Детальный морфологический и молекулярный анализ этих нарушений позволил автору сделать важный вывод, что в их основе лежит недостаток белка GAGA у *Trl*-мутантов, изменяющий активность ряда ключевых генов - регуляторов оогенеза дрозофилы, таких как *saxophone*, *jaguar*, *Actin5C*, *decapentaplegic* и *Delta*.

Исходя из того, что ряд мутаций по гену *Trl* приводит к снижению фертильности у самцов, в разделе 3.5 Элиной Михайловной представлены результаты экспериментов по изучению влияния белка GAGA на развитие гонад и процесс сперматогенеза у самцов дрозофилы. Цитологический анализ *Trl*-мутантов показал, что GAGA участвует в обеспечении механизмов миграции клеток зародышевого пути в процессе эмбриогенеза, а также морфогенезе митохондрий в течение сперматогенеза. Нарушения в миграции клеток зародышевого пути приводят к формированию семенников, содержащих очень небольшое количество половых клеток. Установлено, что эти клетки могут развиваться нормально, приводя к образованию определенного количества спермы. Однако многочисленные митохондриальные дефекты, выявленные у *Trl*-мутантов, приводят у аутофагии в процессе сперматогенеза, в результате у исследованных в работе мутантов *Trl* наблюдается значительное снижение фертильности. Чтобы доказать, что снижение фертильности самцов *Trl*-мутантов связано с уменьшением количества GAGA, были проведены изящные эксперименты по «спасению» мутантного фенотипа семенников с помощью трансгенов *hsp83:GAGA-519* и *hsp83:GAGA-581*, образующих функционально нормальные продукты гена *Trl*. У самцов *Trl*-мутантов, несущих хотя бы одну копию трансгена, полностью восстанавливается нормальный сперматогенез и фертильность. Эти данные

показали, что причиной снижения фертильности самцов *Trl*-мутантов, действительно, является снижение количества GAGA. В конечном итоге проведенные исследования позволили автору сделать обоснованный вывод об участии белка GAGA в регуляции развития половой системы самцов дрозофилы.

В разделе 3.6 исследовано влияние белка GAGA на формирование глаза дрозофилы. Использование полученных в данной работе *Trl*- мутаций позволило автору выявить целый ряд не описанных ранее для этого гена нарушений в процессе формирования глаза. В частности, при анализе поверхности глаз и их цитологических срезов впервые было продемонстрировано, что у этих мутантов наблюдаются изменения в количестве фотонейронов и конусных клеток, а также нарушения в ориентации как отдельных омматидиев, так и в организации рядов омматидиев. По предположению автора, эти эффекты связаны с изменением экспрессии генов *lz* и *Bar*, которые, согласно полученным данным, являются генами-мишенями GAGA. Для гена *lz*, играющего важную роль в процессе формирования глаза, эта гипотеза была подтверждена с помощью Вестерн-блот анализа, показавшего снижение относительного количества белка Lz в глазо-антеннальных имагинальных дисках 0-часовых предкуколок мутантов *Trlen82 / TrlR85* и *Trl362 / TrlR85*. Эксперименты по *in vitro* связыванию GA-богатого фрагмента из 5'-области гена *lz* с рекомбинантным белком GAGA также подтверждают предположение автора, что экспрессия гена *lz* может напрямую регулироваться белком GAGA. Те же самые подходы были использованы при анализе взаимодействия *Trl* -мутаций с геном *Bar*. В регуляторных районах генов из комплекса *Bar* были выявлены сайты связывания GAGA. Методом Вестерн-блот гибридизации показано, что экспрессия гена *Bar* усиливается на фоне уменьшения экспрессии гена *Trl*. После генетического анализа проявления фенотипа мутантов *B1 / +* на фоне *Trl*-мутаций автор делает окончательное заключение, что в норме белок GAGA обеспечивает репрессию генов *Bar*.

Положительной особенностью главы 3 (Результаты и обсуждение) является наличие небольших заключений в конце каждого раздела, в которых обобщаются данные о наблюдаемых дефектах органогенеза у *Trl* мутантов и рассматриваются возможные причины того, с изменением активности каких генов эти дефекты связаны, что облегчает восприятие большого и детального описательного массива экспериментальных данных, и позволяет лучше ориентироваться в полученных автором результатах.

Замечания к работе:

В целом все вынесенные на защиту положения и сформулированные соискателем выводы базируются на большом, хорошо осмысленном экспериментальном материале. Рукопись иллюстрирована качественно выполненными рисунками и схемами, написана хорошим литературным языком и с интересом читается. Автореферат и печатные работы Э.М. Баричевой в полном объеме отражают основное содержание диссертации.

К недостаткам работы можно отнести встречающиеся стилистические погрешности, а также синтаксические и пунктуационные ошибки. В подписях к рисункам 14 (с.57), 36 (с.116), 54 (с.158) и 57 (с.160) отсутствует описание их отдельных элементов. Однако указанные неточности существенного негативного влияния на общую высокую оценку работы не оказывают.

Заключение.

Диссертация Э.М. Баричевой представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой с применением современных молекулярно-генетических и цитологических методов были получены новые данные о механизмах регуляции генов у высших эукариот. Полученные автором данные вносят существенный научный вклад в область знаний о функциональной организации генома и развитии эукариот.

Учитывая актуальность темы исследования, объем проделанной работы, высокий экспериментальный уровень исследований, а также значимость и новизну полученных данных, можно утверждать, что диссертационная работа Баричевой Элины Михайловны “Ген *Trithorax-like Drosophila melanogaster*, его экспрессия и роль в онтогенезе”, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 (генетика), соответствует критериям, предъявляемым Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а сам автор, несомненно, достоин присуждения искомой степени.

Официальный оппонент
доктор биологических наук

по специальности 03.02.07 (генетика),

заведующий лабораторией,

630090, г. Новосибирск,

пр. Лаврентьева д. 8/2,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (ИМКБ СО РАН)

Тел.: (383) 36-39-059 (раб.); +7-913-903-37-24 (моб.)

E-mail: demakov@mcb.nsc.ru

Сергей Анатольевич Демаков

