

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО Директора Федерального
государственного учреждения
Института общей генетики им.
Н.И. Вавилова
д.б.н., проф.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Лисачева Артема Павловича "Сравнительный анализ структуры, синапсиса и рекомбинации половых хромосом разного эволюционного возраста у позвоночных", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - "Клеточная биология, цитология и гистология".

Диссертационное исследование А. П. Лисачева посвящено выявлению эволюционных закономерностей процесса дифференциации между половыми хромосомами у представителей гетерогаметного пола и обусловленных ими изменениями мейотического поведения гетероморфных половых хромосом.

Целью работы является выяснение особенностей спаривания и рекомбинации половых хромосом у представителей таксонов, имеющих половые хромосомы относительно молодого, среднего и древнего эволюционного возраста на примере гуппи, анолисов и крачек, и сравнение их с хорошо известными из литературы особенностями спаривания и рекомбинации гетероморфных половых хромосом млекопитающих.

В отличие от млекопитающих, половые хромосомы которых демонстрируют лишь поздние этапы эволюции половых хромосом, данные о ранних этапах дифференцировки половых хромосом, формировании специфических особенностей их синапсиса и рекомбинации в мейозе, относительно малочисленны и нередко противоречат друг другу, даже, в случаях, когда речь идет о хромосомах одного и того же вида. Наиболее показательны в этом отношении данные об особенностях поведения половых ZW хромосом в ооцитах курицы. Поэтому актуальность работы А.П. Лисачева, посвященной

сравнительному исследованию систем половых хромосом у костистых рыб, рептилий и птиц, очевидна и не вызывает сомнений.

Работа построена по традиционному плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы (включающий 207 источников). Общий объем работы составляет 113 страниц. Представлено 25 рисунков и 4 таблицы.

Во "Введении" автор дает краткий обзор проблемы, на решение которой направлена работа, называет цель и задачи исследования, которые полностью соответствуют поставленной цели, определяет степень новизны полученных результатов и их научно-практическую ценность, обозначает личный вклад автора в работу, приводит положения, выносимые на защиту.

"Обзор литературы" представляет собой ценную сводку мировых достижений в области исследования базовых генетических механизмов, приводящих к детерминации пола у позвоночных и эволюции половых хромосом. Этот раздел блестяще структурирован. Сложный многоуровневый материал этой главы, в которой автор демонстрирует широкую компетентность в самых разных областях современной биологии - эволюционной теории, классической и эволюционной цитогенетики, клеточной и молекулярной биологии, зоологии, изложен живо, интересно, хорошим литературным языком. Детально анализируя данные, полученные из разных источников, и точно вычлняя спектр значимых, но нерешенных до сих пор вопросов исследуемой проблемы, автор в конце обзора обстоятельно обосновывает выбор каждого из видов животных для решения задач собственного исследования и методических подходов к их решению.

В результате для исследования выбраны виды, имеющие половые хромосомы разного эволюционного возраста: гуппи с относительно молодыми половыми (XY) хромосомами (возраст - 10-15 млн лет); игуановые ящерицы, с промежуточным между птицами и гуппи возрастом половых хромосом (около 70-80 млн лет) и птицы, возраст половых (WZ) хромосом которых насчитывает около 100 млн лет. Исследованы самцы обыкновенных гуппи и гуппи Эндлера, самцы каролинского и белогубого анолисов, птенцы женского пола в возрасте 1-3 суток речной и черной крачек. Время дивергенции между этими двумя видами крачек составляет 8 - 9 млн лет, что дало возможность выявить различия в строении древних половых хромосом, возникших за короткое эволюционное время.

Из раздела "Материалы и методы" следует, что большинство исследований проведено на препаратах распластанных ядер сперматоцитов и ооцитов I порядка (или "препаратах СК"). Преимуществом этого метода перед другими методами цитогенетического анализа хромосом является низкая компактизация хромосом и, соответственно, высокая точность

локализации сайтов спаривания гомологов и рекомбинации между ними с помощью иммуоцитохимического анализа, а также возможность идентификации специфических последовательностей хроматина с помощью FISH и GISH. Для визуализации СК использованы антитела против основного белка боковых элементов синаптонемного комплекса (SYCP3); для визуализации точек рекомбинации антитела против белка mismatch-репарации - MLH1. Анализ СК позволяет выявить даже небольшие гетероморфизмы между микрохромосомами, проявляющиеся в асимметрии СК, как например, это выявлено автором у рептилий. Особой оценки заслуживает дифференцированный подход к идентификации половых хромосом у разных групп животных. Так, у гуппи для идентификации полового бивалента впервые использован метод С-подобного окрашивания хроматина с использованием DAPI и метод GISH с флуоресцентно меченой пробой ДНК самца после фиксации результатов иммуоокрашивания. Перспективность использования разработанного автором С-подобного окрашивания хроматина DAPI подтверждено выявлением на половом биваленте того же дистального блока повторяющихся последовательностей, которые были выявлены с помощью GISH.

Половой бивалент у анолисов был идентифицирован по морфологии, а также по наличию DAPI-позитивной области, выявляемой на необработанных препаратах без С-подобного окрашивания. У *Anolis carolinensis* были дополнительно использованы сортировочные пробы микрохромосом. Необходимо подчеркнуть, что использование богатого арсенала методов во всех случаях обеспечило очень высокое качество всех приведенных в диссертации фотографий, полученных методами световой, флуоресцентной и электронной микроскопии.

Материалы, приведенные в разделах "Результаты" и "Обсуждение" убедительно подтверждают целесообразность использования комплекса выбранных автором методов исследования. В результате проведенного сравнительного анализа структуры, синапсиса и рекомбинации половых хромосом разного эволюционного возраста у позвоночных автором впервые установлена важная закономерность, заключающаяся в том, что по мере увеличения степени дивергенции половых хромосом синаптическая подгонка гетероморфных половых хромосом затрудняется, при этом ее итоговая точность уменьшается, а граница региона подавленной рекомбинации на половом биваленте обозначается резче. Эта тенденция прослеживается и у млекопитающих.

Совершенно неожиданным подтверждением этой закономерности могут служить особенности мейотического поведения половых хромосом у самцов двух уникальных видов рода *Ellobius* - *E. tancrei* и *E. talpinus* - видов с гомоморфными (!) (XX) половыми

хромосомами и у самцов, и у самок. В профазе I мейоза граница региона подавленной рекомбинации на половом биваленте у этих самцов обозначена резко от стадии зиготены до стадии диплотены, такие участки запрещенного синапсиса не проявляют никаких признаков пригонки. Хроматин асинаптированных участков подвержен инактивации. Рекомбинационные узелки выявляются только в двух коротких теломерных участках синапсиса. Короче, здесь также проявляется зависимость между запретом рекомбинации и запретом выравнивания (подгонки) между половых хромосом. Кстати, у самцов этих двух видов, как впрочем и других млекопитающих, подтверждается и вторая закономерность синапсиса, впервые выявленная автором у гуппи. А именно то, что синапсис эволюционно молодых половых X- и Y-хромосом гуппи, как и их аутосом, начинается в дистальном районе половых хромосом, где локализуется подавляющее большинство кроссоверов. Именно так, (правда с обоих и центромерного, и дистального) теломерных концов начинается синапсис у слепушонок с акроцентрическими XX хромосомами, причем на каждом из концов полового бивалента выявляется не более одного сигнала MLH1.

Далее автором впервые показано, что, в противовес ранее принятой точке зрения, X- и Y- микрохромосомы каролинского и белогубого анолисов различаются по размеру и морфологии. На них определена локализация дифференцированного района. Выявлена инверсия, отличающая друг от друга половые хромосомы изученных видов. Описаны особенности рекомбинации и синапсиса половых хромосом. Эти данные представляют особый интерес в связи с растущим интересом генетиков к изучению анолисов, постепенно приобретающих роль модельных объектов.

Автором впервые выявлены кариотипические различия между речной и черной крачками, описаны особенности синапсиса и рекомбинации их Z- и W-хромосом, определены размеры и расположение псевдоаутосомного района. Описаны детали синапсиса и подгонки более длинной Z-хромосомы к более короткой W-хромосоме. Отмечена незавершенность подгонки синапсиса между Z- и W, которая проявляется в сохранении разного положения центромер. Псевдоаутосомный район занимает короткий дистальный сегмент на р-плече W- хромосомы. Установлено, что при сокращении псевдоаутосомного района до минимальных размеров интенсивность рекомбинации на нем становится выше, чем на аутосомах, и граница цитологически идентифицируемого псевдоаутосомного района выражена резко.

Раздел "Обсуждение" включает три подраздела, в которых детально проанализированы и обобщены собственные данные, и данные литературы, касающиеся начальных, промежуточных и поздних этапов дифференциации половых хромосом. Автор детально рассматривает особенности синапсиса и рекомбинации хромосом у разных групп

животных, сопровождая обсуждение полученных результатов четкими схемами, подчеркивая важные детали выявленных особенностей мейотического поведения хромосом и особенностей их кариотипов.

Выводы, сделанные автором, полностью соответствуют полученным результатам.

Автореферат адекватно отражает суть и содержание диссертационной работы. Результаты работы достаточно полно представлены в 11 статьях, включая 7 статей в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК. 5 из них опубликованы в международных научных журналах: *Paleontological Journal*, *Zebrafish*, *Cytogenetic and Genome Research*, *Comparative Cytogenetics*, индексированных в базе WOS. Материалы диссертации были представлены на 4-х международных научных конференциях и хорошо известны специалистам.

Научно-теоретическое значение представленной к защите работы очевидно. Это относится и к прекрасно разработанным сценариям методических подходов к каждому эксперименту и личным методическим разработкам автора.

Несмотря на самую высокую оценку работы в целом, вынуждена отметить некоторые досадные упущения, допущенные автором в ходе её оформления.

1. В "Списке литературы", среди 207 ссылок, приведены лишь две ссылки на отечественные работы, выполненные А.П. Лисачевым с соавторами. Вместе с тем, работы, посвященные исследованиям эволюции половых хромосом, анализу синапсиса половых хромосом у ряда видов млекопитающих, выполненные в нашей стране были в разные годы, опубликованы в отечественных и международных изданиях (Гилева, 1981, 1990; Ахвердян, 1993; монография Богданов, Коломиец, 2007; Баклушинская, 2009; Matveevsky et al., 2016 и др.). Правда, на одну нашу работу (Kolomiets et al., 1991) автор все-таки ссылается в тексте, однако не включает ее в список литературы.

2. Еще одним упущением автора считаю отсутствие списка использованных в тексте сокращений.

Заключая, следует подчеркнуть, что новизна и научная значимость полученных автором результатов, их глубокое теоретическое осмысление, позволили автору установить новые закономерности в процессах дивергенции половых хромосом, и особенностей эволюции их синапсиса и рекомбинации.

По существу, диссертационное исследование А.П. Лисачева знаменует новый этап в развитии фундаментальных представлений о дивергенции между половыми хромосомами на ранних этапах эволюции позвоночных и эволюции особенностей синапсиса и рекомбинации между ними в профазе I мейоза.

В целом, работа Артема Павловича Лисачева полностью соответствует всем критериям (пп. 9-14) "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор - Лисачев Артем Павлович, несомненно, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04. – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Отзыв обсужден и одобрен на заседании лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН протокол № 5 от "5" июня 2017 года.

Зав. лабораторией цитогенетики
ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН
д.б.н., профессор

кол -

Коломиец Оксана Леонидовна

Тел. 8 (499) 135-53-61
e-mail: olkolomiets@mail.ru
ул. Губкина, д. 3
Москва, 119991

Подпись О.Л. Коломиец заверяю

Ученый секретарь
ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова,
д.б.н., доцент

О.Л. Коломиец



Огарькина Ольга Александровна