

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Малиновской Любови Петровны на тему:
«Хромосома, специфичная для клеток зародышевого пути, у певчих воробьиных птиц», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика

Диссертационная работа Любови Петровны Малиновской посвящена изучению - уникальной хромосомы GRC (*Germline Restricted Chromosome*), которая обнаруживается в клетках зародышевого пути, и не выявляется в соматических клетках у видов, принадлежащих к подотряду Певчих воробьиных птиц отряда Воробьинообразные.

Диссертация построена по классическому сценарию и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы. Работа изложена на 83 страницах. Содержит 18 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 133 источника.

Во "Введении" автор четко определяет цели и задачи исследования, формулирует положения, выносимые на защиту, характеризует актуальность и новизну исследования, перечисляет конференции, на которых материал диссертации был представлен.

Целью работы Любови Петровны Малиновской было исследование поведения GRC в мейозе и наследственной передачи этой хромосомы у певчих птиц.

К поставленной цели автор продвигается, решая следующие основные задачи.

1. Определить степень распространенности GRC у птиц и оценить эволюционное время возникновения GRC;
2. Определить степень гомологии между GRC различных видов птиц;
3. Исследовать копийность и поведение GRC в мейозе у ласточки-береговушки, бледной ласточки и большой синицы и предложить модель наследования GRC в ряду поколений.

Обзор литературы. Глубокий по смыслу и широкий по охвату филогенетического разнообразия объектов, материал этой главы хорошо структурирован, изложен четко и интересно. В первой части обзора автор проводит детальный анализ оригинальных работ и обзоров, посвященных особенностям процесса запрограммированной элиминации ДНК у многоклеточных животных разных таксонов, характеризует распространение и особенности запрограммированной элиминации ДНК у беспозвоночных и позвоночных животных, сопровождает изложение схемами и существенными комментариями к ним. К сожалению, автор нигде не упоминает имени выдающегося немецкого биолога Теодора Бовери, первооткрывателя самого явления диминуции. Кстати, рисунок 1. в диссертации представляет собой лишь модификацию рисунка Т. Бовери (1910), сделанную Streit et al в 2016 г

Очень интересен и следующий раздел, посвященный анализу состава последовательностей ДНК, подвергающихся запрограммированной элиминации и роли этого явления в развитии различных организмов. Здесь автор раскрывает новые смыслы феномена диминуции хроматина, которые постепенно открываются с помощью современных методов анализа генома. Так, у паразитических нематод в состав элиминирующихся последовательностей входят как тандемные повторы, так и кластеры генов, причем те, которые экспрессируются преимущественно во время гаметогенеза и/или раннего эмбриогенеза и не востребованы на более поздних этапах онтогенеза. У морской миноги диминуции подвергаются гены, ортологи которых у мыши являются мишенями для действия репрессорного белкового комплекса (PRC) в эмбриональных стволовых клетках, при этом PRC играет важную роль в сайленсинге генов плюрипотентности, онкогенов

В следующем разделе обзора автор описывает историю открытия и исследований GRC у певчих птиц у зебровой амадины (Pigozzi, Solari 1998, 2005), а позже и у японской амадины (Del Priore, Pigozzi, 2014).

Далее автор приводит данные литературы, касающиеся особенности женской репродуктивной системы и основных особенностях женского мейоза у птиц.

Заключая обзор литературы, автор детально обосновывает выбор экспериментальных объектов, направлений и методов собственного исследования, опираясь на данные литературы, глубоко проанализированные в обзоре.

Глава "Материалы и методы." Из этого раздела следует, что автором впервые проведено исследование мейотических и митотических хромосом у 14 видов, принадлежащих к 9-и семействам подотряда певчих птиц. Причем, у 4 из них исследованы и сперматоциты, и ооциты. Кроме того, исследованы птицы 4 отрядов – Курообразных, Стрижеобразных, Ржанкообразных и Соколообразных. Следует отметить, что разнообразие жизненных циклов исследованных видов птиц требует серьёзных знаний биологии каждого вида. Это особенно важно при работе с ооцитами, т.к. получить клетки на стадии пахитены у самок удается только на 3-6 сутки после вылупления птенца. Любовь Петровна участвовала как в отлове взрослых особей нескольких видов, так и в сборе яиц. Впечатляет не только количество исследованных автором видов, но трудоемкость и арсенал использованных методов, внушительное количество мейотических клеток, исследованных у разных видов.

Для идентификации GRC в формирующихся половых клетках птиц, автор использовал так называемые препараты распластанных хромосом. К сожалению, автор не описывает детали получения таких препаратов, ограничиваясь лишь ссылкой на работу Peters et al. (1997), хотя речь идет об одном из основных методов, использованных в работе, известном лишь узкому кругу исследователей, имеющих собственный опыт анализа СК.

Процедура иммуноокрашивания препаратов описана подробно, с перечнем первичных и вторичных антител, целей их использования, особенностей разведения антител. Объявлена и коммерческая принадлежность антител.

Для получения препаратов митотических метафазных хромосом выбрана наиболее удачная модификация этого метода, согласно которой клетки костного мозга культивируют с колхицином *in vitro* в течение 2-х часов, что исключает влияние колхицина на мейотические клетки. Очевидно, что при параллельных исследованиях синаптонемных комплексов, выбрана наиболее адекватная модификация метода получения метафазных пластинок. Правда, ссылки на автора метода здесь, к сожалению, нет.

Методы получения Cot-1 ДНК и GRC-специфичных гибридизационных проб, их мечения, а также процедура флуоресцентной гибридизации *in situ* описаны детально и полно.

Приступая к анализу глав "Результаты" и "Обсуждение" считаю необходимым отметить не только впечатляющий объем проведенных Л.П. Малиновской экспериментов, но и высокую степень новизны и научной значимости полученных автором результатов. Автором впервые исследованы клетки зародышевого пути 14 представителей подотряда певчих птиц: грача, ласточки-береговушки, бледной ласточки, деревенской ласточки, садовой камышовки, полевого жаворонка, большой синицы, мухоловки-пеструшки, амадины Гульда, чижа, обыкновенного щегла, домашней канарейки, обыкновенного снегиря и белошапочной овсянки. У всех исследованных видов подотряда певчих птиц впервые выявлена дополнительная хромосома GRC.

Автором впервые выявлена значительная вариация в размере GRC и предложена классификация GRC с подразделением их на макро- и микро-GRC.

Хочу подчеркнуть, что при описании GRC автор детально прописывает диагностические признаки уни- и бивалентов GRC. Это относится и к идентификации половых бивалентов – ZZ и ZW. Важно, что даже при сложностях выявления микро-GRC, автору удалось идентифицировать их у 6 видов птиц, причем, у мухоловки-пеструшки – впервые выявлена метацентрическая GRC.

Несомненно, значимым результатом является и полученное Л.П. Малиновской подтверждение уникальности этого явления именно для подотряда певчих птиц. Автором доказано отсутствие GRC у представителей семи отрядов птиц, в том числе у четырех, лично исследованных автором, и у представителей трех отрядов, результаты исследования которых были опубликованы другими авторами.

Сравнительный анализ генетического содержания GRC, проведенный с помощью межвидовой FISH с использованием микродиссекционных проб GRC, полученных от четырех видов певчих птиц – зебровой амадины, бледной ласточки, японской амадины и чижа выявил гомологию между разными GRC, а также между GRC и хромосомами

основного набора. На основании полученных результатов и данных литературы автор приходит к важному заключению о монофилетическом происхождении GRC около 35-42 млн. лет назад и предлагает собственный убедительный сценарий происхождения и эволюции GRC.

На основе полученных данных о мозаицизме GRC у самок бледной ласточки, большой синицы и зебровой амадины Л.П. Малиновской предложен глубоко аргументированный сценарий передачи GRC в ряду поколений. Следует подчеркнуть, что в основе этого сценария лежат как современные представления об оогенезе птиц и механизмах мейотического драйва, так и результаты, полученные автором. В частности, интересно предположение о том, что «сильная» центромера GRC раньше других отсоединяется от микротрубочек веретена и остается в ооците после первого мейотического деления и т.о. не попадает в полярное тельце. Представляется важным добавить, что у самок птиц, гетероморфных по половым (ZW) хромосомам, (в отличие от гетероморфных по половым (XY) хромосомам самцов млекопитающих), половые хромосомы ZW выравниваются по длине; не инактивируются в профазе I мейоза, и не ассоциируют с унивалантом GRC. Главное, что ни у самок, ни у самцов птиц не происходит ареста мейоза на стадии пахитены при наличии униваланта GRC.

В заключении хочу подчеркнуть, что содержание практически всех глав диссертации подтверждает актуальность исследования диминуции хроматина в целом, и GRC у певчих птиц, в частности. Очевидно, что полученные Л.П. Малиновской результаты и разработанные методы исследования будут полезны в последующих исследованиях GRC. Наиболее интересным представляется дальнейшее исследование генов GRC и их роли в онтогенезе певчих птиц.

Материалы диссертации Л.П. Малиновской полноценно отражены в шести опубликованных работах, пять из которых вышли в высокорейтинговых международных журналах. Содержание автореферата хорошо отражает содержание диссертационной работы. Работа иллюстрирована фотографиями высочайшего уровня, схемами и таблицами.

Высокий методический уровень работы Любови Петровны Малиновской, её объем и глубокий теоретический анализ полученных результатов, несомненно, является результатом огромного труда и одаренности самого диссертанта. Важно и то, что Любовь Петровна Малиновская является участником мощного ансамбля исследователей GRS в Новосибирске, прошла школу исследований мейоза в лаборатории рекомбинационного и сегрегационного анализа ИЦиГ СО РАН. Очевидно, что и взаимодействие с орнитологами, эмбриологами, цитологами, молекулярными биологами, генетиками сыграло важную роль в выполнении работы очень высокого уровня.

Диссертационная работа Любови Петровны Малиновской по актуальности, новизне, методическому исполнению, фундаментальности и ценности полученных результатов отвечает всем требованиям п. 9 – 11. «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции 01.10. 2018 г. с изменениями от 26.05.2020 г.), а ее автор – Любовь Петровна Малиновская, несомненно заслуживает присуждения ей искомой научной степени кандидата биологических наук по специальности –генетика – 1.5.7.

Доктор биологических наук, профессор
Заведующая лабораторией цитогенетики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Коломиец Оксана Леонидовна

Подпись Коломиец О.Л. подтверждаю
Ученый секретарь
ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН
д.б.н., профессор
Абилев Серикбай Каримович



119991, Российская Федерация, Москва, ул. Губкина д. 3. Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт общей генетики им Н.И. Вавилова РАН
Телефон 8-(499)-135-14-61

28.02.2022