

## ОТЗЫВ

о диссертационной работе **Дины Александровны Малькеевой**  
**«Влияние делеции гена малого белка теплового шока *Hsp67Bc* на устойчивость *Drosophila melanogaster* к различным типам стресса»,**  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальностям 1.5.22. – «клеточная биология» и 1.5.7. – «генетика».

### Актуальность исследования

Белки теплового шока – важнейшая составляющая эукариотической клетки. Они обладают множеством высоко консервативных функций, значение которых для поддержания гомеостаза трудно переоценить. Белки теплового шока разнообразны, и функции каждого белка, при существенной функциональной общности всех представителей семейства, имеют свою специфику. В связи с этим изучение каждого белка теплового шока имеет несомненный интерес и совершенно необходимо для создания цельного и исчерпывающего представления о механизмах сохранения стабильного функционального состояния клеток и организма в целом.

Особую актуальность проведенному Д. А. Малькеевой исследованию придает тот факт, что в современных условиях изменение климата, техногенные воздействия и другие вызовы усиливают необходимость совершенствования наших знаний, касающихся фундаментальных молекулярно-генетических и клеточных механизмов поддержания гомеостаза, с целью выработки, в случае необходимости, научно обоснованных практических подходов к сохранению биоразнообразия и самой жизни на Земле.

### Научная значимость и новизна исследования

Исследованный в работе Д. А. Малькеевой малый белок теплового шока *Hsp67Bc* мало изучен. Полученные новые данные значительно расширяют наши представления об особенностях функциональной роли этого белка в ответе на стрессовые воздействия различной природы. В результате проведенной работы впервые было показано, что участие белка *Hsp67Bc* в контроле ответа на различные температурные воздействия имеет определенную специфику. Так, наиболее существенное влияние отсутствие этого белка оказало на восстановление животных после холодового шока. Эффект делеции гена, кодирующего белок, зависел также от стадии развития и пола организма. Полученные результаты подчеркивают сложность системы ответа клеток на стрессы. Более того, Д. А. Малькеевой удалось показать, что отсутствие *Hsp67Bc* приводит не только к отрицательным для организма последствиям, таким, как повышенная чувствительность к холоду, но и к положительным, например, увеличению продолжительности жизни в нормальных условиях.

Особый интерес представляет тот факт, что нокаут гена *Hsp67Bc* нарушает разнообразные признаки организма – не только чувствительность к изменению температуры, но и продолжительность жизни, структуру яичников, процесс макроаутофагии, а также интактность клеток глаз мух в присутствии белка Ataxin-3 человека с удлинённым полиглутаминовым трактом. Множественность функций исследуемого белка *Hsp67Bc*, впервые выявленная в ходе выполнения диссертационной работы благодаря использованию самых разнообразных тестов,

указывает на его комплексную роль в организме и ранее не очевидную взаимосвязь, взаимозависимость различных протекающих в нем процессов.

Отмечу, что диссертационная работа представляет собой очень подробное, детальное и разностороннее исследование влияния *Hsp67Bc* на организм, что, безусловно, является сильной стороной работы и повышает ее научную значимость.

### **Структура работы, достоверность и обоснованность научных результатов**

Диссертация построена по стандартному плану. Во введении традиционно охарактеризована актуальность проведенного исследования, сформулированы цель и многообразные задачи работы, представлены положения, выносимые на защиту, кратко охарактеризована новизна и практическая ценность полученных результатов, а также приведены другие формальные показатели – личный вклад автора в работу, публикации в рецензируемых журналах по теме диссертации и выступления на научных конференциях, подтверждающие достоверность полученных результатов.

Глава «Обзор литературы» состоит из пяти неравноценных по объему разделов и заключения. Первый (вводный) и второй разделы посвящены рассмотрению белков теплового шока и содержат информацию, необходимую для того, чтобы представить себе место исследуемого в работе белка *Hsp67Bc* в суммарном наборе белков теплового шока клетки. Два следующих раздела посвящены собственно белку *Hsp67Bc*. Думаю, учитывая их относительную краткость и тематику, эти разделы вполне можно было объединить. Наконец, в пятом разделе рассмотрены особенности процесса макроаутофагии. Обзор насыщен фактами, изложение хорошо организовано, текст дополнен удачными рисунками.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание экспериментальных подходов, использованных в работе, число и разнообразие которых впечатляет. Они включают как генетические процедуры и различные способы получения фенотипических характеристик мух, так и молекулярные методы, включая методы измерения уровня экспрессии генов и секвенирование, а также различные варианты микроскопии, включая электронную. Именно такой комплексный подход обусловил полноту и высокое научное качество полученных в работе функциональных характеристик *Hsp67Bc*.

Глава «Результаты исследования» начинается с описания процедуры получения линии с делецией гена *Hsp67Bc*. Большим достоинством работы является масштабность и одновременно тщательность как самих проведенных экспериментов, так и их описания в тексте. Представленные результаты не оставляют сомнения в том, что для дальнейшего исследования был получен адекватный материал. Основная часть главы посвящена описанию влияния делеции гена *Hsp67Bc* на мух – важнейшие фенотипические признаки, связанные с жизнеспособностью, продолжительностью жизни, устойчивостью к температурным стрессам, а также защитные внутриклеточные процессы. Важно, что в результате удалось охарактеризовать специфику исследуемого белка теплового шока в ряду других таких белков. Хочется также отметить логику и осмысленность исследования, описанного в диссертации. Например, отсутствие ожидаемого ярко выраженного влияния *Hsp67Bc* на чувствительность/устойчивость к высокой температуре стимулировало Д. А. Малькееву, с одной стороны, к анализу

чувствительности/устойчивости к другим стрессам – низкой температуре, белковому голоданию, инфекции, а с другой стороны – к поиску компенсаторных механизмов, обуславливающих слабую связь Hsp67Bc с высокой температурой. Другой пример: в работе всегда объясняется, на основании чего выбраны те или иные стадии или тот или иной возраст для анализа исследуемых признаков. Этот выбор важен для получения адекватных данных, и обоснованность выбора существенно увеличивает ценность результатов. В целом, подход к научному исследованию свидетельствует о сформировавшейся высокой квалификации автора диссертационной работы.

Глава «Обсуждение» разбита на две части в соответствии с основным функциональным значением белка Hsp67Bc, выявленным в диссертационной работе. В первой части автор работы подробно обсуждает выявленные особенности влияния Hsp67Bc на чувствительность/устойчивость к изменению температуры. Обсуждение затрагивает чрезвычайно интересные вопросы адаптации дрозофилы к окружающей среде и возможности выживания личинок, куколок и имаго в зимний период в условиях умеренного и холодного климата. Вторая часть посвящена обсуждению роли Hsp67Bc в контроле процесса макроаутофагии. Помимо предположений о возможных молекулярных и клеточных механизмах такого контроля, Д. А. Малькеева предлагает интересную гипотезу, связывающую участие Hsp67Bc в контроле макроаутофагии с его ролью в контроле продолжительности жизни. В целом, характер обсуждения полученных данных свидетельствует об эрудиции и высоком научном потенциале автора работы. Краткое «Заключение» и подробно написанные «Выводы» завершают работу и дают возможность еще раз оценить ее достойный уровень и многообразие полученных результатов.

Высокий научный уровень диссертационной работы не исключает ряда вопросов и замечаний к представленным в ней результатам и характеру их изложения. Сделанные замечания не снижают высокую оценку работы.

- 1) В таблице с описанием линий указано, что линия  $w[*]; P\{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR\}12$  содержит ген, кодирующий GAL4, экспрессия которого регулируется промотором гена *glass*. Это не совсем точно, в этой линии экспрессия гена, кодирующего GAL4, регулируется фрагментами промотора гена *ninaE*, содержащими сайт связывания с белком Glass.
- 2) В диссертации не всегда указано, сколько повторностей того или иного опыта было сделано. Эта информация важна, когда представлены количественные данные, например, результаты количественной ПЦР в реальном времени. Сколько было биологических и технических повторностей в этих опытах? Кроме того, почему в качестве референса в этих опытах использовали *αTubulin84B*? Сравнимо ли количество РНК исследуемых генов с количеством РНК *αTubulin84B*? Правильно ли я понимаю, что был использован один референс? Общепринятым является использование, по крайней мере, двух.
- 3) В работе подробно описаны статистические методы. Однако мне осталось непонятным, почему для анализа плодовитости было принято решение о коррекции на множественность сравнения средних. Плодовитость оценивали

в разном возрасте, но ведь в каждой временнОй точке анализу подвергались не одни и те же, а разные данные.

- 4) В некоторых случаях на рисунках не отмечена достоверность различий, хотя в тексте на нее указывается, или ошибки (например, рисунки 18В, 21Б).
- 5) В разделе 3.2 написано, что влияние делеции на плодовитость самок недостоверно, хотя визуально наблюдается некоторое ее снижение. Формально это означает, что снижения нет. Однако автор далее пишет о намерении разобраться в причинах снижения плодовитости. Стоит более аккуратно представлять и обсуждать такого рода результаты.
- 6) В разделе 3.3 написано, что в природных популяциях мух утери гена *Hsp67Bc* не фиксировалось, однако ссылка на источник этих сведений не приведена.
- 7) Есть ли какие-то предположения о возможном влиянии *Hsp67Bc* на процесс макроаутофагии в отсутствие волбахии?

### **Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии её требованиям ВАК**

Диссертационная работа Д. А. Малькеевой является законченным, актуальным, оригинальным, выполненным на высоком научном и методическом уровне исследованием. Результаты работы могут быть использованы в образовательных курсах по молекулярной биологии, генетике, цитологии и гистологии, биологии развития, а также в научно-исследовательской работе Институты и Университеты биологического и медицинского профиля. Выводы работы адекватны полученным результатам, опубликованным в журналах из списка ВАК и представленным на различных научных конференциях. Содержание Автореферата отражает содержание диссертации. Диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Д. А. Малькеева, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.22. – «клеточная биология» и 1.5.7. – «генетика».

Заведующая лабораторией геномной изменчивости  
Института молекулярной генетики  
Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт»  
(Москва, пл. Академика И. В. Курчатова, д. 2; +7-499-1961909; [egpas@img.ras.ru](mailto:egpas@img.ras.ru); [egpas@rambler.ru](mailto:egpas@rambler.ru)),  
доктор биологических наук, профессор

*Па*

Пасюкова Елена Генриховна

22.09.2022

Подпись Е. Г. Пасюковой заверяю

Заместитель директора  
Института молекулярной генетики  
Научно-исследовательского центра «Курчатовский институт»,  
доктор биологических наук, профессор



*Сломинский*  
Сломинский Петр Андреевич