

## ОТЗЫВ

официального оппонента Похолковой Галины Витальевны  
на диссертационную работу Малькеевой Дины Александровны  
«Влияние делеции гена малого белка теплового шока HSP67Bc на  
устойчивость *Drosophila Melanogaster* к различным типам стресса»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 1.5.22. – клеточная биология и 1.5.7 - генетика.

**Актуальность темы.** Изучение механизмов, поддерживающих гомеостаз и протеостаз на клеточном уровне в меняющихся жизненных условиях, является актуальной задачей для многих разделов биологии и медицины. Особенно интересны данные о факторах и механизмах, которые могут исправлять или удалять поврежденные клеточные компоненты. Белки теплового шока (HSP) интенсивно экспрессируются, когда необходимо защитить белки от денатурации или агрегации, или восстановить их конформацию. Некоторые из них принимают участие в процессе аутофагии, важном для избавления клеток от ненужного материала. Белок Hsp67Bc у дрозофилы имеет функциональный ортолог – HSPB8 у человека и отсутствие его приводит к тяжелым заболеваниям. Ранее было показано, что этот белок может предотвращать агрегацию мутантных белков, и участвовать или даже инициировать процесс макроаутофагии. Однако большинство результатов были получены на клеточных культурах с использованием нокдауна гена в системе РНК-интерференции. На данном этапе является актуальным накопление данных о функциях и механизмах действия этого белка на организменном уровне, в контексте проблем, связанных с адаптацией организмов в условиях стрессов и меняющейся среды обитания.

Диссертационная работа Д.А. Малькеевой посвящена исследованию функциональной роли малого белка теплового шока у дрозофилы в ситуации отсутствия гена *Hsp67Bc*. Диссертант получила делецию гена и проанализировала жизнеспособность, продолжительность жизни и плодовитость мух при температурных стрессах, агрегацию мутантных белков и особенности процесса макроаутофагии в условиях голодания и заражения *Wolbachia* в линиях с нормальным геном и без него. Впервые полученные автором данные важны для понимания разнообразия механизмов, обеспечивающих стабильность и устойчивость к стрессовым воздействиям. Такое исследование актуально и в плане комплексного анализа нарушений у *D. melanogaster* на организменном, тканевом и клеточном уровне, что расширяет наше представление о роли этого гена.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.** Логика экспериментальной работы хорошо продумана и обеспечена современными методиками и инструментами для получения достоверных результатов. Все эксперименты, выполненные в рамках диссертационной работы Д.А. Малькеевой, проводились в полном соответствии с принятыми в данной области науки протоколами работ. Сильной стороной представленной диссертационной работы является использование данных, полученных из

разных областей биологии: генетики, цитологии и молекулярной биологии. Использование такого подхода позволило диссертанту более полно оценить возможную роль белка Hsp67Bc у дрозофилы, что, безусловно, дополнительно обосновывает выводы, сделанные по результатам работы.

Большим достоинством работы при анализе важности гена в стрессовых ситуациях является детальный анализ характеристик на разных стадиях развития дрозофил от личинок до взрослых мух. При этом похвально, что соискателем для анализа были выбраны именно те временные периоды, на которых ранее было выявлено увеличение экспрессии гена Hsp67Bc. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения поскольку для контроля была выбрана линия мух, полученная, как и линия с делецией, в экспериментах с вырезанием Р-элемента. В данном случае точное удаление Р-элемента полностью восстановило структуру гена *Hsp67Bc*. Это в какой-то степени уравнивало генотипы двух линий. При анализе влияния температурных стрессов **впервые** было показано, что устойчивость *D. melanogaster* к воздействию холода зависит от стадии развития и пола мух, (наиболее чувствительны самки). Поскольку в умеренном климате зимующие оплодотворенные самки поддерживают популяцию, то нормально функционирующий ген *Hsp67Bc* должен способствовать лучшему выживанию природных популяций мух. Более того, изменения динамики экспрессии гена *Hsp67Bc* в этих стрессовых условиях позволили автору предположить, что продукт гена играет важную роль в процессах устранения полученных повреждений.

Особый интерес представляют исследования, связанные с изучением процесса макроаутофагии при отсутствии продукта гена *Hsp67Bc* в яичниках голодающих мух и нейронах мух, зараженных *Wolbachia*. Были использованы современные цитологические методы: окраска органов, флуоресцентная гибридизация *in situ*, получение ультратонких срезов с последующим анализом на лазерно-сканирующем конфокальном микроскопе или при помощи электронного микроскопа. В результате, **впервые** было показано увеличение, по сравнению с контролем, количества аутофагических вакуолей, как в яичниках, так и в нейронах мух, т.е. слабое, но увеличение интенсивности макроаутофагии. При этом тонкий анализ выявил увеличение размера аутолизосом в нейронах, что указывает на нарушение этапа связывания лизосом с аутофагосомами. Таким образом, отсутствие гена *Hsp67Bc* повлияло, с одной стороны, на усиление макроаутофагии, а, с другой, замедлило процесс созревания аутофагосом. В целом, эти результаты, свидетельствовали о вяло текущей макроаутофагии и в нормальных условиях, позволили соискателю объяснить увеличение продолжительности жизни мух без гена по сравнению с мухами, имеющими нормальный ген.

Полученные Д.А. Малькеевой результаты характеризуются несомненной научной новизной, вносят весомый вклад в развитие областей знаний о функциях и механизмах действия *Hsp* генов, играющих ключевую роль в обеспечении выживаемости организмов, и будут широко востребованы научным сообществом. Результаты и выводы из них не вызывают сомнений.

Все положения, выносимые на защиту и выводы, сформулированные в диссертации, основаны на достоверных экспериментальных данных. Методы статистического анализа данных корректны и соответствуют современному уровню их развития. Полученные выводы не противоречат ранее опубликованным результатам. Экспериментальные данные, полученные в рамках диссертационного исследования,

оригинальны или подтверждают представленные ранее на культурах клеток, что существенно расширяет информацию о роли гена в природных популяциях.

**Структура и объем работы.** Диссертация написана хорошим языком, легко читается. Диссертационная работа изложена на 123 страницах, содержит 31 рисунок и 5 таблиц. Включает оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы из 180 источников. В целом, работа оформлена в соответствие с требованиями, предъявляемыми ВАК РФ к диссертационным работам, хорошо проиллюстрирована. Следует отметить как высокое качество обзора литературы, так и корректное использование собственных и ранее полученных данных при обсуждении результатов и формулировании выводов.

**Замечания по диссертационной работе.** Принципиальных замечаний по написанию и оформлению диссертационной работы, которые снижали бы ее научную ценность, нет. Единственным небольшим замечанием является отсутствие в автореферате схемы молекулярно-генетической организации района гена *Hsp67Bc* с инсерцией Р-элемента и после вырезания. Хотя на словах описание приведено, но более наглядно, в виде рисунка, это представлено в диссертации.

В порядке дискуссии хотелось бы спросить у автора:

1. Ген *Hsp67Bc* экспрессируется с различной интенсивностью на всех стадиях развития мух, начиная с эмбриональной. Замечали ли вы разницу в числе личинок первого возраста в нормальной и мутантной линиях. Во всех ли отложенные яйца идет нормальное развитие. И не задерживаются ли в развитии личинки и куколки в 0-аллельной линии.
2. Поскольку в условиях белкового голодания процесс макроаутофагии усиливается в обеих линиях, но в мутантной, по-видимому, переваривание в аутолизосомах замедленно и строительный материал поступает цитоплазму с задержкой, то, как это может повлиять на продолжительность жизни особей обеих линий

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней.**

Экспериментальная и аналитическая части рассматриваемой диссертации выполнена на высоком уровне. Диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в результате которой впервые был изучен вклад гена малого белка теплового шока *Hsp67Bc D.mtlanogaster* в формировании у мух ответа на воздействие температурного стресса на организменном уровне: он играет важную роль в устойчивости к пониженной температуре и вовлечен в процесс макроаутофагии на стадии созревания аутофагосом. Работа Дины Александровны актуальна, впервые полученные данные важны для понимания разнообразия механизмов, обеспечивающих стабильность и устойчивость к стрессовым воздействиям

Положения диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли апробацию на 5 международных конференциях и опубликованы в 4 научных статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах научных публикаций Web of Science и Scopus. Автореферат корректно отражает содержание работы.

Учитывая актуальность, несомненную научную новизну, теоретическую и практическую значимость, высокую степень достоверности и достаточную апробацию результатов выполненного исследования, считаю, что представленная диссертационная работа соответствует всем критериям, установленным в пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24 сент. 2013 г. N 842), а её автор Дина Александровна Малькеева заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.22. – клеточная биология и 1.5.7 - генетика.

Ведущий научный сотрудник лаб. молек. цитогенетики  
ИМКБ СО РАН,  
д.б.н. Г.В. Похолкова



**Похолкова Галина Витальевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаб. молек. цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук. Адрес: г. Новосибирск, 630090, пр. Академика Лаврентьева 8\2, тел.: +7 913 203 06 65 , эл. почта: galina@mcb.nsc.ru

