

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Романова Станислава Евгеньевича
“ Роль белков CP190 и CG9879 в регуляции генов дифференцировки сперматоцитов
Drosophila melanogaster ”, представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.7. – «Генетика»

Функционирование эукариотического генома поддерживается точно скоординированными механизмами регуляции генной экспрессии, которые обеспечивают корректную работу конкретного гена на определенной стадии развития или в определенной ткани организма. Различный эпигенетический статус хроматина и его динамичная архитектура в ядре могут обеспечивать дифференциальную экспрессию генов и, как результат, специализацию клеток.

Работа Романова С.Е. посвящена изучению молекулярного механизма, лежащего в основе изменения активности тканеспецифичных генов, в процессе дифференцировки клеток. В качестве модельной системы был выбран процесс сперматогенеза у *D. melanogaster*. Действительно, данная модельная система является наиболее удобной, поскольку каждая стадия дифференцировки легко идентифицируется, имеет молекулярные маркеры. Кроме того, имеющийся широкий набор генетических инструментов (мутаций) позволяет вносить необходимые изменения в модельную систему, обеспечивая лучшее понимание происходящих процессов.

В работе Романова С.Е. была прослежена динамика связывания белка CP190 в процессе дифференцировки клеток мужского зародышевого пути и исследована роль CP190 в регуляции экспрессии генов дифференцировки в сперматоцитах. Автор обнаружил преимущественное нарушение в экспрессии tMAC (паралог соматического dREAM комплекса)-зависимых генов дифференцировки сперматоцитов по сравнению с tTAF комплексом (паралог TFIID комплекса). Кроме того, было обнаружено tMAC-зависимое взаимодействие CP190 с мишенями двух транскрипционных активаторов в сперматоцитах. Совокупность полученных данных позволяет автору сделать вывод о том, что в отличие от генов «домашнего хозяйства», где белок CP190 проявляет себя как активатор экспрессии, в тканеспецифичных генах мужского зародышевого пути он выступает как опосредованно действующий репрессор.

Отдельно хотелось бы отметить созданную автором оригинальную генетическую систему, позволяющую изучать инактивацию белка CP190 эксклюзивно в тканях мужского

зародышевого пути. Ранее исследование инактивации CP190 в сперматогенезе *D. melanogaster* было невозможно, поскольку мутантные организмы не доживают до стадии имаго. Используя систему сайтспецифических рекомбиназ и тканеспецифичных «драйверов» на фоне ноль мутации по гену *cp190*, Романов С.Е. добился стабильной экспрессии белка CP190 в соматических клетках и, одновременно, его инактивации в тканях мужского зародышевого пути. Важно, что работа данной системы «условного спасения» была проверена многочисленными экспериментами. Следует отметить, что хорошо зарекомендовавший себя метод «условного спасения», предложенный Романовым С. Е., может быть использован в различных лабораториях, сталкивающихся со схожими проблемами в процессе исследований. Это говорит о значительной практической значимости проведенной диссертантом работы.

Очень любопытные результаты были получены Романовым С.Е. при исследовании участия белка CP190 в организации барьеров для распространения репрессивного Polycomb зависимого хроматина, маркированного H3K27me3 гистоновой меткой, в дифференцированных клетках слюнных желез *D. melanogaster*. Было показано, что в данной ткани, в отличие от эмбриональных клеток, CP190 не участвует в формировании барьерной функции, но эту роль скорее выполняет метилтрансфераза SetDB1. Полученные данные указывают на динамическую пластичность в регуляции хроматиновых доменов в ходе дифференциации клеток.

Автор исследовал белок CG9879, гомолог TBP, который может быть промежуточным звеном в генетическом каскаде, контролирующем семенник-специфичные гены в сперматоцитах. Однако делеционный анализ и полногеномное секвенирование показали ошибочность такого предположения и возможность компенсации активности CG9879 в сперматогенезе за счет других паралофов. Полученные Романовым С.Е. результаты указывают на избыточность в контроле регуляции генов дифференцировки мужского зародышевого пути, что может свидетельствовать о необходимости поддержания стабильности этой важной генетической системы.

Все вышесказанное подчеркивает актуальность и новизну исследования, проведенного диссертантом.

Диссертационная работа, изложенная на 130 страницах и иллюстрированная 15 рисунками и 5 таблицами, написана по традиционной схеме и включает разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы и Список литературы.

Обзор литературы (включает 242 источника) является достаточно подробным и охватывает ряд проблем, имеющих прямое отношение к теме диссертации. Подробно описано современное представление о процессе дифференцировки клеток в ходе сперматогенеза. Обсуждаются, в частности, современные представления о молекулярной основе запуска регуляторного каскада активации генов в сперматоцитах и участие системы Polycomb-зависимой репрессии в регуляции семенник-специфичных генов. Подробно описаны гены задержки мейоза. Однако для лучшего восприятия материала желательно было бы ввести таблицу гомологии между соматическими и семенник-специфичными паралогами, либо уже в этом разделе дать ссылку на рисунок 2.

Отдельный раздел посвящен роли инсуляторного белка CP190 в регуляции генов. Подробно описана доменная организация белка, однако не хватает её схематичного изображения. Это улучшило бы восприятие материала. Подробно описана роль белка CP190 в функционировании инсуляторных комплексов, формировании границ «функциональных доменов» и топологически ассоциированных доменов (ТАД). Однако разница между «функциональными доменами» и ТАД не отражена достаточно чётко, что создает некоторую путаницу в восприятии материала. Кроме того, белок CP190, также как и BEAF, невозможно относить к полноценным инсуляторным белкам, поскольку они часто ассоциированы с активными промоторами и генами «домашнего хозяйства», которые могут определять границы ТАД. В связи с этим диссертант справедливо отмечает, что не ясна связь между формированием ТАД и локализацией белков CP190 и BEAF на их границах.

В заключительной части литературного обзора, Романов С.Е. детально описывает современное представление об участии ТВР и его паралогов в регуляции транскрипции генов.

Хотелось бы отметить, что автор даёт критическую оценку ранее полученным экспериментальным данным и сформулированным на их основе гипотезам, что значительно облегчает восприятие и понимание изложенного материала.

В разделе «Материалы и методы» содержится детальное описание использованных в работе экспериментальных подходов, приведены подробные протоколы экспериментов, что позволяет при необходимости полностью воспроизвести все то, что было сделано автором в ходе работы. Диссертационная работа выполнена с применением современных методов.

Раздел «Результаты экспериментов» написан очень подробно. В частности, детально обсуждаются эффекты, которые инактивация CP190 оказывает на экспрессию tMAC зависимых генов дифференцировки мужского зародышевого пути. Данный раздел хорошо иллюстрирован, рисунки выполнены в цвете, чёткие, содержат всю необходимую информацию. Как уже было сказано выше, в данной диссертационной работе были

получены совершенно новые интересные результаты, расширяющих современные представления об участии CP190 в регуляции экспрессии генов мужского зародышевого пути. Однако хотелось бы сделать ряд замечаний:

- Почему на рисунке 4Г на верхней панели при обработке антителами к CP190 наблюдается окрашивание только периферийных клеток сперматоцитов?
- Почему нормализация экспрессии на ген домашнего хозяйства *Actin42A* на рисунке 4В и 5 приведена в разных единицах?
- На странице 73 не корректно указаны ссылки на рисунок 9Б, в то время как описывается рисунок 9А.
- На рисунке 11 не приведён контрольный DamID-профиль для связывания белка Comr в клетках мужского зародышевого пути без мутации *mir40*.

В разделе «Обсуждение результатов экспериментов» информация, полученная в ходе экспериментов, суммируется и на её основе строятся обоснованные предположения и предлагаются перспективы дальнейших исследований. Хотелось бы отметить, что обсуждение результатов построено грамотно: автор не позволяет себе излишне далеко отходить от фактической информации, полученной в опытах. Практически всем экспериментальным данным даётся непротиворечивое объяснение, а в случае наличия возможности нескольких интерпретаций, все они подробно обсуждаются. В результате выводы, сделанные по итогам проведённых исследований, ёмки, лаконичны, непротиворечивы и полностью подкреплены фактическим материалом.

С учетом всего сказанного, можно заключить, что диссертационная работа Романова Станислава Евгеньевича на тему «Роль белков CP190 и CG9879 в регуляции генов дифференцировки сперматоцитов *Drosophila melanogaster*» соответствует требованиям п. 7 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №74 от 30.01.2002 г. (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ №475 от 20.06.2011 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «Генетика».

Ведущий научный сотрудник ИБГ РАН,
и.о. зав.лаб. Молекулярной генетики дрозофилы
д.б.н., профессор РАН Головнин А.К.
Тел. 9031731814
email: agolovnin@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)
Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334



ПОДПИСЬ *Головнина А.К.*
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИБГ РАН Набирочкина Е.Н.

17 января 2022 г.

6x 2121/10
26.01.2023