

## ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Д.В. Юдкина 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

### **Актуальность темы диссертационной работы.**

Дифференцировка генеративных клеток, как один из элементов и примеров дифференцировки клеток многоклеточного организма является крайне сложным процессом, в регуляцию которого вовлечены тысячи генов. Активация этих генов должна очень четко регулироваться и нарушения этой регуляции могут приводить к остановке развития мужских половых клеток. Особенностью дифференцировки сперматоцитов у дрозофилы является взрывная активация транскрипции более тысячи узкоспециализированных семенник-специфичных генов. Некоторые гены, в частности транскрипционные факторы, участвующие в дифференцировке, описаны, однако основные механизмы остаются неизученными. В связи с этим поставленная в диссертационной работе С.Е. Романова задача – изучение роли белков CP190 и CG9879 в регуляции активности генов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster* безусловно является актуальной и имеет важное фундаментальное значение.

### **Научная значимость и новизна работы:**

1. Автором впервые разработана система условного спасения мутантов по гену *Cp190*, которые не доживают до стадии имаго. Разработанная система позволила внести этот ген только в выбранные клетки, что не повлияло на жизнеспособность мух и позволило исследовать активность гена. 2. С.Е. Романовым впервые показана связь белка CP190 с комплексом tMAC и показано, что взаимодействие CP190 с мишенями также зависит от tMAC. Показано, что CP190 координирует взаимодействие между факторами транскрипции и генами дифференцировки. 3. Автором опровергнута гипотеза о взаимодействии белка CP190 с границами доменов H3K27me3, при этом показана связь SetDB1 с этими границами. 4. Впервые показана колокализация CG9879 и комплекса tTAF, что указывает на возможное участие CG9879 в инициации транскрипции, однако делеция этого гена не приводит к каким-либо значимым нарушениям у дрозофилы.

Выполненное Романовым С.Е. исследование имеет несомненную **теоретическую значимость**. Полученные данные о функциях и связывании CP190 с хроматином

значительно расширили представления о роли и механизмах действия инсуляторных белков. Полученные данные имеют важное значение для дальнейших исследований структуры и функций хроматина половых клеток.

**Практическое значение работы** заключается в том, что разработанная система условного спасения летальных мутантов может быть успешно использована в других исследованиях и на других объектах.

**Достоверность представленных в диссертации результатов** не вызывает сомнений и обеспечивается: 1. правильным выбором *Drosophila melanogaster* как объекта исследований; 2. выбором самых современных методов и использованием адекватного оборудования; 3. большим объемом полученных данных и их тщательным анализом.

Все проведенные эксперименты имеют адекватные контроли и соответствующую статистическую обработку. Выводы и положения, выносимые на защиту, корректны и соответствуют полученным результатам.

Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Материалы работы представлены на 3 научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 3 научных статьи в журналах из перечня ВАК:

1. Laktionov P.P., Maksimov D.A., **Romanov S.E.**, Antoshina P.A., Posukh O.V., White-Cooper H., Koryakov D.E., Belyakin S.N. Genome-wide analysis of gene regulation mechanisms during *Drosophila* spermatogenesis // *Epigenetics and Chromatin* – 2018. №11(14). DOI: 10.1186/s13072-018-0183-3.

2. Kalashnikova D.A., Maksimov D.A., **Romanov S.E.\***, Laktionov P.P., Koryakov D.E. SetDB1 and Su(var)3-9 play non-overlapping roles in somatic cell chromosomes of *Drosophila melanogaster* // *J Cell Sci* – 2021. №134(2). – jcs253096. DOI: 10.1242/jcs.253096.

3. **Романов С.Е.**, Шлома В.В., Коряков Д.Е., Белякин С.Н., Лактионов П.П. Инсуляторный белок CP190 регулирует экспрессию генов дифференцировки сперматоцитов в клетках мужского зародышевого пути *Drosophila melanogaster* // *Молекулярная биология. Принята к печати.*

#### **Характеристика диссертации.**

Материалы работы изложены на 130 страницах машинописного текста, по общепринятому плану и включают в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы».

Диссертация содержит 15 рисунков и 5 таблиц. Список цитируемой литературы включает 242 источника.

**Введение** к диссертационной работе написано в соответствии с требованиями ВАК. В нем представлена вся информация, необходимая для общей характеристики работы. Актуальность темы работы хорошо обоснована и не вызывает сомнений. Цель и задачи работы логично следуют из ее актуальности и подкрепляются описанием степени ее разработанности в мировой науке, также представлена новизна проделанного исследования. В этом разделе представлены «основные положения, выносимые на защиту» которые соответствуют основным выводам работы и подтверждены списком публикаций автора из трех статей в высокорейтинговых изданиях. В этом же разделе представлена апробация результатов работы на конференциях и личный вклад автора.

**Обзор литературы** представлен на 30 страницах и написан очень подробно. Вся представленная в литобзоре информация имеет прямое отношение к теме диссертационной работы. Автор подробно описывает генетический механизм сперматогенеза у дрозофилы с анализом работы генов и генных каскадов. В разделе описана работа семенник-специфичных генов и генов задержки мейоза. Представлена информация о регуляции экспрессии этих генов комплексами Polcomb, tTAF и tMAC. Детально описана роль инсуляторного белка CP190, который является одним из основных объектов диссертационного исследования. Представлена его роль как белка посредника и барьерного белка хроматиновых доменов. Также описана роль фактора ТВР и ряда его паралога в регуляции транскрипции. Обзор литературы заканчивается кратким заключением, которое резюмирует существующие знания по данной теме и обозначает основные направления исследования. Обзор литературы дает полное представление об области исследований, представленной в диссертационной работе, и позволяет провести критический анализ результатов, полученных автором.

**Материалы и методы** представлены на 14 страницах и описывают экспериментальные процедуры, которые были использованы в ходе исследования. Данный раздел дает полное представление об использованных генетических, молекулярно-биологических, биоинформатических и теоретических методах. Описание методик соответствует общепринятым нормам. Приведено подробное описание используемых генетических конструкций и генетических линий *Drosophila melanogaster*. Романов С.Е. использовал широкий спектр методов и подходов, все из которых адекватны поставленным задачам, что свидетельствует о высокой квалификации автора.

В главе **Результаты** логично и последовательно описаны все полученные научные результаты. Глава состоит из семи разделов. В **первом** и **втором** разделах автор подробно описывает схему получения и схему работы системы условного спасения мутантов на основе генетической кассеты, окруженной loxP-сайтами и интегрированного гена Cre-рекомбиназы под управлением промотора гена *nanos*, для удаления флоксированной кассеты в клетках зародышевого пути. Приводится описание получения трансгенных *Drosophila melanogaster* и исследование уровней экспрессии встроенного в кассету гена *Cp190* до удаления и после удаления кассеты, а также в сравнении с диким типом. В **третьем** разделе автором путем анализа транскриптома определяет влияние прекращения экспрессии гена *Cp190* на транскрипцию генов дифференцировки. В результате выделено две группы генов с разными направлениями изменения уровней транскрипции. Показано, что в группе генов, повышающих экспрессию, значительно представлены семенник-специфичные гены. В **четвертом** разделе с использованием теоретических подходов диссертантом показана взаимосвязь белка CP190 с генами мишенями комплекса tMAC. В **пятом** разделе описано исследование связывания CP190 с хроматином и взаимодействие с tTAF и tMAC. В разделе **шесть** приведен теоретический анализ распределения CP190 по границам доменов H3K27me3 и показано, что этот белок не имеет отношения к этим границам. Также продемонстрировано, что маркирует такие границы метилтрансфераза SetDB1. В разделе **семь** исследовано влияние белка CG9879 на транскрипцию генов дифференцировки сперматоцитов. Автором показано, что делеция гена *CG9879* не приводит к значимым нарушениям экспрессии других генов и функций семенников. Предположено, что это связано с тем, что функции этого гена заменяются другими паралогами *Tbr*.

В главе **Обсуждение** автор сопоставляет полученные результаты с ранее опубликованными данными. В частности, обсуждаются результаты анализа экспрессии генов при удалении спасающей кассеты *Cp190* в клетках зародышевого пути, роль белка CP190 в организации хроматина, поддержании доменной структуры и регуляции транскрипции, а также роль ТВР и подобных белков в регуляции транскрипции геном при дифференцировке сперматоцитов.

В целом, представленная работа изложена логично и последовательно. Рисунки полностью отражают полученные результаты и позволяют оценить их достоверность. Выводы однозначно обоснованы и четко сформулированы и соответствуют результатам экспериментов. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, публикации отражают практически все полученные результаты.

Принципиальных замечаний к содержанию диссертационной работы нет. При чтении работы, тем не менее, появился ряд незначительных вопросов и замечание:

1. Непонятно, почему на рисунке 4А проводится количественная оценка спасающей кассеты в семенниках мух  $Cp190^2/Cp190^3$  в сравнении с имагинальными дисками *Drosophila melanogaster* +/+, а не этой же линии. В тексте также нет обсуждения этого момента.

2. Рисунок 5 и рисунок 4В показывают уровень экспрессии *Cp190* относительно нетрансгенных *Drosophila melanogaster*, но выражены в разных единицах, в одном случае проценты, в другом доли. По графикам соотношение уровней экзона 4 и 3'НТО отличается. Имеет ли это биологический смысл?

3. В разделе 3.6 не понятно, по какому принципу автор выбрал в качестве объекта исследования распределение метилтрансферазы SetDB1, это никак не объясняется в разделе и этого нет в задачах.

4. Также в диссертации имеется незначительное количество опечаток и случаев использования «научного жаргона», что в целом не влияет на положительное впечатление от работы.

Приведенные замечания носят, в основном, рекомендательный характер и ни в коей мере не снижают моей высокой оценки диссертационной работы С.Е. Романова.

#### **Заключение.**

Диссертационная работа Романова Станислава Евгеньевича «Роль белков CP190 и CG9879 в регуляции генов дифференцировки сперматоцитов *Drosophila melanogaster*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика, является законченной научной работой в которой автор использует большой комплекс самых современных подходов для исследования роли инсульторного белка CP190 и фактора транскрипции CG9879 в дифференцировке мужских половых клеток. Полученные результаты вносят значительный вклад в знания о механизмах и путях точной регуляции генов при дифференцировке клеток многоклеточного организма. По актуальности, новизне, научной и практической значимости, а также методологическому и методическому уровню полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор,

Романов Станислав Евгеньевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – генетика.

**Официальный оппонент:**

кандидат биологических наук, заведующий отделом геномных исследований Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

Дмитрий Владимирович Юдкин

Юридический адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия  
Фактический адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Телефон: +7 (383) 363-47-10 (доб. 2608)  
Электронная почта: [yudkin\\_dv@vector.nsc.ru](mailto:yudkin_dv@vector.nsc.ru)

Подпись Д.В. Юдкина заверяю:

Начальник отдела кадров

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора

01.02.2023



И.В. Ильин