



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки**

**Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

Моск. от 02.02.2023 № 12312-13/27

На № _____ от _____



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИМБ РАН

д.б.н., академик РАН

Георгиева София Георгиевна

31.01. 2023 г.

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук о диссертационной работе Романова Станислава Евгеньевича по теме «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 ИССЛЕДОВАНИЯ

Регуляция клеточной дифференцировки является одним из наиболее актуальных вопросов современной биологии развития. В свою очередь, исследование регуляторных механизмов, контролирующих специализацию клеток мужского зародышевого пути, важно для всестороннего понимания процессов, лежащих в основе передачи наследственной информации между поколениями. В ходе специализации мужских половых клеток шаровидные диплоидные сперматоциты претерпевают два деления мейоза и после

сложных морфологических преобразований превращаются в гаплоидные подвижные сперматозоиды. Перед вступлением в мейоз в сперматоцитах дрозофилы синхронно активируется более тысячи генов дифференцировки, которые больше нигде в организме не функционируют. Однако молекулярные механизмы масштабной активации сперматоцит-специфичных генов остаются загадочными. В работе Романова С.Е. исследуется роль белков CP190 и CG9879 в регуляции генов дифференцировки сперматоцитов. CP190 является одним из ключевых инсуляторных белков *Drosophila melanogaster*, который управляет активностью генов через контроль дистальных промотор-энхансерных взаимодействий или установку барьеров между активными и неактивными районами хроматина. Долгое время функции этого белка в контексте клеточной дифференцировки оставались невыясненными. В свою очередь, белок CG9879 является ранее неизученным представителем семейства гомологов ТАТА-бокс связывающего белка (ТВР). Известные представители этого семейства вовлечены в инициацию транскрипции. Новизна и актуальность представленных результатов не вызывает сомнений. С использованием методов молекулярной генетики и геномики Романову С.Е. удалось продемонстрировать функциональную взаимосвязь между CP190 и активаторами сперматоцит-специфичных генов. Это позволяет по-новому взглянуть на роль инсуляторных белков дрозофилы в регуляции процессов развития. Кроме того, в работе показано взаимодействие CG9879 с генами дифференцировки клеток мужского зародышевого пути. Этот результат интересен ввиду растущего внимания исследователей к участию гомологов базальных факторов транскрипции в управлении процессами дифференцировки.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ И НАУЧНОЙ НОВИЗНЫ РАБОТЫ

Диссертационная работа Романова С.Е. хорошо структурирована, написана по стандартной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 130 страницах, содержит 15 рисунков и 5 таблиц. Полученные данные опубликованы в трех рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, представлены на международных научных конференциях, вошли в состав сборника статей.

Во введении обоснована актуальность и описана степень разработанности темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, изложены научная новизна, теоретическая и научно-практическая ценность, вклад автора и положения, выносимые на защиту. Представленная соискателем работа посвящена изучению *in vivo* роли белков CP190 и CG9879 в регуляции активности генов дифференцировки в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. Выбор объектов для исследования обусловлен несколькими гипотезами. Индукция генов дифференцировки в сперматоцитах происходит

за счет кооперативного действия двух специализированных транскрипционных активаторов – tTAF и tMAC. Однако только часть генов связывается с этими факторами напрямую. Автор диссертации предполагает, что белок CP190 может быть задействован в непрямой регуляции генов дифференцировки сперматоцитов, поскольку в соматических клетках его функция необходима для регуляции мишеней транскрипционного репрессора MMB/dREAM, гомологичного tMAC. Автор считает, что исследование взаимодействий CP190 *in vivo* может прояснить вопросы относительно функции этого белка в ходе дифференцировки клеток. Так, хотя показано, что CP190 устанавливает границы доменов репрессии Polycomb в эмбрионах дрозофилы, остается неясным, нужен ли этот фактор для поддержания барьеров на последующих этапах развития. В свою очередь, выбор белка CG9879 обусловлен предположением, что сперматоцит-специфичные гены дифференцировки контролируются транскрипционными факторами, чья экспрессия напрямую зависит от tTAF и tMAC. Однако только ген CG9879 кодирует транскрипционный фактор и является прямой мишенью этих комплексов. Задачи, поставленные в работе, соответствуют теме и цели исследования: соискатель использует методы молекулярной генетики и геномики, чтобы выяснить, с какими мишенями в геноме сперматоцитов взаимодействуют CP190 и CG9879, а также на какие гены они влияют.

Обзор литературы структурно разбит на три части. В первой части подробно рассмотрены современные представления о механизмах регуляции генов дифференцировки в развивающихся сперматоцитах дрозофилы. В этом разделе автор формулирует гипотезы о связи белков CG9879 и CP190 с масштабной активацией генов, запускаемой активаторами tTAF и tMAC на терминальных этапах развития клеток мужского зародышевого пути. Во второй части описываются известные данные о функции инсульторного белка CP190. Автор подробно останавливается на важной роли инсульторных белков в эпигенетической регуляции генов, однако обращает внимание, что большинство исследований выполнены либо на эмбрионах, либо на культурах клеток. Третий раздел посвящен современным данным об участии генов-гомологов ТВР в регуляции генов дрозофилы. Поскольку в диссертации впервые проведено исследование белка CG9879 в контексте генетической регуляции, такая структура литературного обзора вполне оправдана. Представленный обзор охватывает большой объем литературных данных (список литературы включает 242 источника), прослеживается скрупулезная работа по каждому разделу рассматриваемой темы, тема работы раскрыта полностью.

Раздел материалы и методы содержит подробную информацию о методологии исследования. Работа проведена с использованием современных молекулярно-генетических, цитологических и геномных методов. В работе также широко используется биоинформатический анализ данных. Информация дана в достаточной для понимания мере.

Глава результаты объединяет в себе экспериментальные и теоретические данные, полученные автором. Этот раздел разбит на семь частей, каждая из которых описывает различные этапы исследования, что существенно облегчает восприятие материала. В ходе выполнения работы Станиславом Евгеньевичем была создана генетическая система для спасения мутации по гену *Cr190* при возможной одновременной специфичной инактивации белка CP190 в клетках мужского зародышевого пути дрозофилы. В работе показано, что CP190 принимает участие в контроле транскрипции семенник-специфичных генов. Кроме того, автором исследовано распределение сайтов связывания CP190 на хромосомах клеток мужского зародышевого пути на разных этапах дифференцировки и у терминально-дифференцированных клеток слюнных желез. Одна часть исследования посвящена изучению гипотезы об участии CP190 в поддержании барьеров на границах доменов репрессии Polycomb. Используя данные, полученные в настоящем и других исследованиях на слюнных железах личинок, автор показывает, что в терминально дифференцированных клетках CP190 не локализуется с границами доменов и часто обнаруживается внутри них. Напротив, автор обнаруживает сильную связь между положением барьеров и сайтами связывания гистон-метилтрансферазы SetDB1. В последней части работы при помощи геномного редактирования автором получены мутанты с потерей функции гена *CG9879*, сделаны и проанализированы транскриптомы семенников у созданных мутантов. Результаты, изложенные в этом разделе, хорошо проиллюстрированы, что существенно упрощает понимание результатов.

В главе обсуждение автор дает разностороннюю оценку полученных результатов в соответствии с имеющимися в литературе данными и четко подчеркивает их новизну. Эта глава заканчивается заключением, где автор кратко резюмирует результаты и логично подводит итог обсуждению проделанной работы.

Выводы диссертации согласуются с целью и задачами исследования, свидетельствуя о полноте и завершенности проведенного исследования.

Список литературы цитирует 242 работы, значимая часть из которых опубликованы за последние годы в ведущих журналах по данной тематике.

Достоверность полученных автором данных не вызывает сомнений, тема работы раскрыта полностью, поставленная цель достигнута, выводы обоснованы и логично вытекают из описания и обсуждения результатов. Основные результаты получены автором самостоятельно. Положения, выносимые на защиту, корректно отражают оригинальные результаты исследования.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации соответствует установленным требованиям и полностью отражает результаты проведенной работы.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Полученные автором данные являются новыми и актуальными, они расширяют представления о механизмах, определяющих активность генов в ходе клеточной дифференцировки дрософилы. Романовым С.Е. были исследованы аспекты эпигенетической регуляции экспрессии генов дифференцировки сперматоцитов инсуляторным белком CP190, а также впервые исследован новый сперматоцит-специфический транскрипционный фактор CG9879, для которого соискателем впервые были созданы мутации с потерей функции.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДОВ ДИССЕРТАЦИИ

В работе была также разработана система для инактивации гена *CP190* в сперматоцитах взрослых мух. Эта система основана на Cre/LoxP-опосредованной рекомбинации и может быть модифицирована для исследования других эпигенетических факторов. Преимуществом системы является то, что она позволяет изолировать клетки с нарушенной функцией исследуемого белка методами сортировки. Это дает возможность изучать функции белков в отдельных клетках взрослых мух. Разработанная система для индуцированной инактивации целевого белка на фоне спасения фенотипа в других тканях может применяться для работы с генами дрософилы, мутации по которым являются ранними летальными, что будет востребовано многими учеными.

ВОПРОСЫ И ЗАМЕЧАНИЯ

Несмотря на высокий научный уровень диссертационной работы имеется ряд замечаний и вопросов

Хотя большинство методов, используемых в работе, описаны достаточно подробно некоторые моменты освещены не полностью. Например:

1. «Электрокомпетентных бактерий добавляли 1-10 мкл ДНК», нет концентрации.
2. Редактирование генома с помощью CRISPR/Cas9 в методах описано не полностью. Схема получения делеции и объяснения как отбирали трансформантов приводится уже в тексте результатов.
3. Эффективность удаления спасающей кассеты оценивали при помощи метода $\Delta\Delta St$, экспрессию CP190 измеряли методом стандартной кривой. Для построения стандартной кривой использовали серийные разведения образцов геномной ДНК личиночных имагинальных дисков самок *y1w67; CP190-mCD8-*

GFP. Почему выбраны имагинальные диски?

4. В разделе 2.12. при описании метода DamID-seq автор пишет: « Обработку образцов производили по протоколу, описанному в работе [180] с модификациями, указанными в [181]». Совсем нет описания метода.

Имеются также вопросы и замечания к изложению результатов работы.

1. На рис 3 В у генотипа *Cp190* (*y1w67; CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre; Cp1902/Cp1903*) видны лишь ранние круглые сперматиды, в то время как у дикого типа также видны удлиняющиеся сперматиды с хвостами. При этом вы пишете, что такие самцы обладали нормальной жизнеспособностью и не демонстрировали видимых нарушений сперматогенеза, а в обсуждении говорится о нормальной фертильности мутантных самцов. При этом в работе данные по изучению фертильности самцов не приводятся. В подписи к рисунку не написано какого возраста были самцы, из которых были сделаны препараты. Возможно у мутантных самцов происходит задержка или удлинение времени прохождения сперматогенеза.

2. В работе описываются 2 набора генов: (Набор №1) 120 генов, чья экспрессия усиливалась на фоне мутации *Cp190* и (Набор №2) - 63 гена, уровень экспрессии которых снижался. К сожалению, в тексте диссертации нет перечня этих генов с кратким описанием их функций. Эта информация может быть полезной для анализа роли *Cp190* в сперматогенезе.

3. В рисунке 7Б не подписана самая левая часть рисунка. Эти гены имеют соматическую специализацию?

4. В тексте работы присутствуют пунктуационные ошибки и опечатки:

Так в рис. 8Б нет подписи кластер 1 и 2; в разных рисунках, по разному обозначается начало транскрипции, либо НТО или TSS; на странице 73 автор ссылается на рисунок 9Б, имея ввиду рисунок 9А. Однако общее количество ошибок невелико и не мешает восприятию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа С.Е. Романова «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 научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне, в которой получены новые данные о механизмах регуляции генов дифференцировки на терминальных этапах развития клеток мужского зародышевого пути.

По содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, а также практической ценности полученных результатов диссертационная работа Романова С.Е. полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения научных степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор работы

заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.07 – генетика.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара лабораторий молекулярных механизмов биологической адаптации и лаборатории эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов (протокол №85 от 30.01.2023).

Ведущий научный сотрудник
ЛММБА ИМБ РАН, д.б.н. *Зац* Зацепина Ольга Георгиевна

30 января 2023

Сведения о составителе отзыва:

Зацепина Ольга Георгиевна, доктор биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Адрес: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Телефон: 8(926)7251575

Электронная почта: olzacepina@yandex.ru

Сведения о лице, утвердившем отзыв:

Георгиева София Георгиевна, академик РАН, доктор биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, директор ИМБ РАН.

