



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИМББ СО РАН

Д.б.н. Демаков Сергей Анатольевич

«08» сентября 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Симоненко Александра Владимировича

«Роль генов *escargot* и *shuttle craft*, кодирующих нейрональные транскрипционные факторы, в контроле продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 - Генетика

Актуальность темы исследования

Продолжительность жизни людей растет, поэтому несомненную актуальность приобретает изучение факторов достижения здорового долголетия. В частности, интересным и очень актуальным направлением научных исследований является поиск генов-мишеней, влияя на которые можно снизить скорость старения. Известно, что нервная система играет важную роль в контроле продолжительности жизни, поэтому большой интерес представляет получение новых данных о непосредственном участии конкретных генов в этом контроле и механизмах такого участия. Ранее, в рамках поиска генов-кандидатов на роль регуляторов продолжительности жизни, было показано, что к таким регуляторам относятся некоторые гены, кодирующие нейрональные транскрипционные факторы. Целью диссертационной работы Александра Владимировича было исследование влияния генов двух таких транскрипционных факторов - *esg* и *stc* - на продолжительность жизни, функцию нервной системы и транскрипцию генов мишеней. Поиск и исследование новых факторов, влияющих на продолжительность жизни животных и человека является очень актуальной задачей, так как нацелено в конечном итоге на применение полученных знаний для повышения продолжительности жизни и качества жизни людей.

Значимость, полученных автором результатов, для науки и практики

В диссертационной работе впервые продемонстрировано влияние уровня экспрессии генов *esg* и *stc* на продолжительность жизни; выявлена специфика этого влияния в зависимости от ткани (стадии развития). Впервые выявлена взаимосвязь между индуцированными нарушением работы генов *esg* и *stc* изменениями продолжительности жизни и подвижности мух, характеризующей функциональный статус нервной системы. Были получены новые факты, указывающие на половую специфичность контроля продолжительности жизни. Было показано, что влияние гена *stc* на продолжительность жизни самок зависит от того, происходило ли скрещивание с самцами. Впервые продемонстрировано, что снижение нейрональной экспрессии генов *esg* и *stc* влияет на продолжительности жизни. Впервые показано, что снижение эмбриональной транскрипции *stc* влияет на экспрессию ряда генов-

мишеней, связанных с функциями нервной системы на стадии эмбрионального развития и приводит к нарушению структуры нейромышечного соединения и уменьшению активности синапсов на более поздней стадии развития. Результаты работы подтвердили связь между структурно-функциональными свойствами нервной системы и продолжительностью жизни, основополагающее значение пола в определении продолжительности жизни, связь между продолжительностью жизни и размножением. Важным итогом работы явилось выявление связи между экспрессией генов в раннем развитии и продолжительностью жизни взрослых особей. Результаты работы могут быть использованы в процессе преподавания в университетах биологического, педагогического, медицинского профиля.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Достоверность полученных результатов основывается на применении адекватных поставленным задачам генетических, физиологических и молекулярно-биологических методов. Исследование проведено на достаточном количестве материала, результаты хорошо проиллюстрированы, осмыслены и подробно обсуждены. Важно отметить, что результаты были опубликованы в престижных журналах. Выводы обоснованы совокупностью приведенных данных и соответствуют поставленным задачам.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа А.В. Симоненко представляет собой законченное научное исследование, изложенное и оформленное согласно требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация построена по классическому плану, включает в себя главы: «введение», «обзор литературы», «материалы и методы исследования», «результаты и обсуждение», заключение, выводы и список литературы (407 источников). Общий объем составляет 152 страницы, в том числе 1 таблица и 17 рисунков. Кроме того, имеется приложение объемом 19 страниц.

В разделе «**Введение**» кратко охарактеризована актуальность проблемы, четко сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, приведены положения, выносимые на защиту, сведения о степени личного вклада автора, данные об апробации результатов и о публикациях по теме диссертационной работы. В самом начале приведен список сокращений и условных обозначений.

Глава «**Обзор литературы**» занимает 49 страниц. В его первой части обсуждается эволюционная консервативность развития, структуры и функции нервной системы, возникновение структурно-функциональных особенностей нервной системы в процессе эволюции. Эта часть обзора литературы написана в историческом ключе, много внимания уделено первым работам, заложившим основы этого направления исследований. В главе затрагиваются очень интересные аспекты генетического контроля формирования нервной системы в эмбриогенезе, однако мне не хватило более четкого акцента на современном состоянии проблемы. Исследование генетической регуляции развития и дифференцировки

нервных клеток у дрозофилы – очень бурно развивающееся направление, в последние годы получено много новых данных по обсуждаемым в этой главе вопросам. Далее Александр Владимирович переходит к детальному описанию организации и генетического контроля развития отдельных структур центральной нервной системы дрозофилы. Здесь уже представлены как классические работы, так и данные последних лет, приводятся данные о взаимодействиях белков и предполагаемые схемы генных каскадов, управляющих развитием соответствующих органов. Эти данные было бы проще воспринимать, если бы в начале была приведена общая схема строения ЦНС дрозофилы. Вторая, очень интересная часть обзора литературы посвящена обсуждению литературных данных об участии нервной системы в контроле продолжительности жизни. Эта глава написана намного живее, тут больше обсуждаются современные данные, читать ее проще и интереснее. Много информации приводится о сложности и разнообразии взаимодействий между факторами внешней среды, работой ЦНС и продолжительностью жизни. При этом отмечается, что сами по себе «внутренние факторы» оказывают на продолжительность жизни большое влияние. Таким образом Александр Владимирович подводит читателя к актуальности поставленных в его диссертационной работе задач.

В этой главе подробно обсуждается роль факторов, регулирующих развитие, поддержание и нормальную работу нервной системы в контроле продолжительности жизни дрозофил. Читая ее, у меня возник вопрос: где граница между «регуляцией» продолжительности жизни (то есть, возникший в результате эволюции механизм, направленный на управление ПЖ) и побочным продуктом нарушений в работе ЦНС. Многие приведенные в главе примеры демонстрируют, что сбои регуляции ЦНС уменьшают продолжительность жизни.

Глава 3 «**Материалы и методы**» демонстрирует широкий диапазон методов, освоенных и с успехом использованных автором. В первую очередь, это методы измерения продолжительности жизни мух, их подвижности, плодовитости и жизнеспособности. Далее идут молекулярно-биологические методы, включающие ПЦР, количественную ОТ-ПЦР, секвенирование ДНК. Кроме того, в работе использованы иммуноокрашивание и световая микроскопия. Отдельная подглава посвящена использованным в работе статистическим подходам к обработке данных.

Большим достоинством я считаю очень детальное описание генотипов всех использованных мух.

Глава «**Результаты и обсуждение**» разбита на несколько частей, каждая из которых состоит из небольшого введения, собственно результатов и их обсуждения.

Часть 4.1 посвящена влиянию гена *escargot* на продолжительность жизни *D. melanogaster*. Во введении подробно описаны данные по экспрессии этого гена. Мне показалось, что читателю было бы намного проще воспринимать результаты главы, если бы Александр Владимирович поместил бы именно сюда характеристику мутации *esg[BG01042]* и ту информацию о транскрипции гена у этих мутантов, которая имелась на начала его собственной работы.

В ходе описания результатов диссертант убедительно показывает, что мутация *esg[BG01042]* приводит к снижению количества транскрипта гена и увеличению продолжительности жизни девственных самцов и самок *D. melanogaster*. Полная реверсия восстанавливает оба признака до контрольного уровня, неполная реверсия приводит к их частичному восстановлению. При этом вызванный РНК-интерференцией нокдаун гена *esg* в нервной системе может приводить как к уменьшению, так и к увеличению продолжительности жизни девственных самцов и самок *D. melanogaster*.

Для того, чтобы показать, что изменения продолжительности жизни связаны с изменением скорости старения, проводятся эксперименты по оценке возрастной динамики подвижности мух. Более того, Александр Владимирович, ссылаясь на литературные данные, пишет, что подвижность мух очень важный признак, характеризующий старение. При этом приведенные в работе результаты (графики) показывают, что угол наклона кривой падения локомоторной активности у мутантов *esg[BG01042]* очень похожи на угол наклона кривой в контроле (что говорит о постоянстве скорости старения), но появляются участки, когда кривая ведет себя качественно иначе. Совершенно удивителен воспроизводимый во всех экспериментах подъем в конце графика у старых мух. Эта "реверсия" воспроизводима. Я считаю, что это очень интересный результат, который говорит о том, что у мутантов в старости происходят какие-то качественные серьезные изменения, тесно связанные с увеличением продолжительности жизни. Но чтобы этот результат интерпретировать, необходимо в будущем исследовать, как тут ведут себя на этом временном отрезке другие признаки старения. На одном из графиков кривая локомоторной активности уходит сильно вверх на возрасте мух 20 дней. В связи с этим у меня возник вопрос: а в 20 дней мухи в норме уже начинают стареть, или это еще возраст "до старения"? Является ли старение мух линейным процессом, или есть какие-то периоды в нормальном развитии, когда старение ускоряется?

Часть 4.2 главы «Результаты и обсуждение» посвящена исследованию влияния гена *shuttle craft* на продолжительность жизни *D. melanogaster*. В этой части Александр Владимирович убедительно показывает, что мутация *stc[KG01230]* приводит к снижению количества транскрипта гена в эмбрионах и увеличению продолжительности жизни девственных самок *D. melanogaster*. Полная реверсия (то есть, удаление встройки трансгена обуславливающего мутацию) восстанавливает оба признака до контрольного уровня. Также оказывается, что мутация также улучшает подвижность мух в старости. Далее приводятся результаты влияния нокдаун гена *stc* в системе РНК-интерференции, с использованием разных драйверных линий и нескольких *stc*-RNAi линий. Полученные результаты показывают, что взаимосвязь между уровнем транскрипции гена *esg*, паттерном его экспрессии в организме и продолжительностью жизни очень сложная и неоднозначная. Снижение транскрипции *esg* может приводить как к уменьшению, так и к увеличению продолжительности жизни мух. Важным результатом работы является выявление ряда генов, экспрессия которых изменяется в ответ на нокдаун гена *stc*.

Очень интересно, что эффект мутации на транскрипцию гена *stc* наблюдается только во время раннего развития, а проявления видны в течение всей жизни дрозифилы. Это пример классической «эпигенетической» схемы, привлекающей большой интерес исследователей в последние 20 лет. Было бы очень интересно в будущем более детально проанализировать транскриптом и эпигеном стареющих мух в этой модельной системе.

Обе части главы «результаты и обсуждения» содержат глубокий анализ полученных результатов с привлечением самых современных литературных данных.

Далее следует глава «Заключение», где еще раз кратко обсуждаются полученные результаты, подводятся итоги и предлагаются дальнейшие перспективы развития работы.

Основные результаты диссертационной работы и их обсуждение изложены в соответствии с поставленными задачами. Приведенные рисунки наглядно иллюстрируют полученные данные.

Выводы соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям. материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает достаточно полное представление о содержании диссертации.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Результаты работы были представлены на девяти конференциях. По результатам работы опубликовано 3 оригинальные статьи в международных рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией и одна обзорная статья.

Замечания и комментарии

Некоторые части работы написаны хорошим, понятным языком и читаются достаточно легко – в первую очередь, мне очень понравились обсуждения результатов. В то же время есть главы, в первую очередь, первая часть обзора литературы, которые написаны очень длинными сложноподчиненными предложениями, не всегда согласованными. Эти части работы читаются тяжело. Текст содержит много опечаток и пунктуационных ошибок.

Не всегда понятна логика последовательности описания результатов. Например, в обеих частях главы «Результаты и обсуждения» описание опытов по анализу продолжительности жизни мух в разных условиях внезапно разрываются характеристикой транскрипции гена у исследуемых мутантов.

В тексте встречаются три варианта написания видового названия объекта исследования: «*D.m.*», «*D. melanogaster*» и *Drosophila melanogaster*. Желательно использовать *Drosophila melanogaster* при первом упоминании, и далее писать *D. melanogaster*.

В главе «обзор литературы» есть глава: «Нейродегенеративные заболевания определяют продолжительность жизни». Мне кажется, лучше было бы сформулировать : «Тесно взаимосвязаны» вместо «определяют».

В главе 2.1.2.5. упоминается «Анализ данных Flybase» о контактах между различными белками. Здесь была бы уместна ссылка не на обобщающую все данные по дрозофиле базу данных, но на первичные данные, на тот проект, в котором эти данные экспериментально получены. Также было бы уместно добавить, каким именно способом был проведен соответствующий анализ.

При описании генетической сети регуляции развития клеток грибовидных тел Александр Владимирович ссылается на статьи 1998 и 2000 года. Насколько оправдано, говоря о генных сетях, ссылаться на статьи дотранскриптомной эпохи?

В главе «Материалы и методы» говорится, что «Используемый лабораторный корм имеет в составе стандартное количество дрожжей и сахара...» . Мой опыт общения с коллегами из разных институтов, работающих с дрозофилой, показал, что не существует «стандартного корма», в каждом институте свои рецепты корма, отличающиеся достаточно сильно по содержанию дрожжей и сахара, и это может влиять (и влияет) на скорость развития и продолжительность жизни.

Глава 1.3 называется «Анализ подвижности линий дрозофил», при этом имеется в виду подвижность мух.

При описании рисунка 6 говорится: «анализ кривых выживания подтвердил, что мутация оказывает влияние на продолжительность жизни, замедляя старение». Мне очень не хватило по тексту четких критериев, по которым можно судить именно о замедлении старения.

В ходе работы анализ данных по локомоторной активности рассматривается как главный критерий, что у мух изменяется не только продолжительность жизни, но и скорость старения. В то же время рисунок 11Ж, в котором у контрольных самок подвижность с возрастом не падала, а возрастала, показывает, что на подвижность могут влиять другие факторы, и она не может однозначно использоваться как характеристика старения. Планируются ли в дальнейшей работе расширить набор критериев скорости старения? История с отсутствием эффекта на подвижность при существенном увеличении продолжительности жизни при нокауте гена *stc* еще раз показывает необходимость введения дополнительных критериев старения мух для лучшей интерпретации результатов.

Графики изменения подвижности имеют сложную форму, было бы интересно добавить точки 10 и 30 суток, чтобы лучше видеть динамику ее изменений и с большей достоверностью делать вывод о характере этой динамики.

В рамках попытки объяснить эффект инсерции трансгена в 3' область гена *esg* Александр проводит большой анализ потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов, поиск мотивов для связывания различных белков. Эта работа не приводит к четкому результату. Известно, что потенциальных мотивов для связывания ДНК-связывающих белков намного больше, чем реальных сайтов их связывания. На будущее я бы посоветовала анализировать не столько потенциальные мотивы для связывания белков, сколько экспериментальные данные по связыванию белков в интересующих тканях. В настоящее время имеется огромный пул опубликованных данных по результатам ChIP-seq. Эти данные позволят получить более соответствующую ситуации в реальных клетках картину распределения тканеспецифических энхансеров и других регуляторных элементов в разных типах клеток.

На рисунке 14 приводится статистический анализ отличий между опытом и контролем, но остается не понятным, какой конкретно параметр оценивали.

При нокадауне *stc* мы наблюдаем очевидные изменения структуры постэмбриональных личиночных синаптических бутонов, сопровождающиеся двукратным снижением количества активных зон синапсов.

Интересно узнать, какие последствия можно ожидать от такого серьезного изменения НС? Казалось, бы, это должно очень серьезно повлиять на все системы организма. В таком случае, эффект на продолжительность жизни может быть очень косвенным следствием нокадауна конкретного гена.

Все перечисленные замечания носят либо редакторский характер, либо призваны показать новые перспективы для дальнейшей работы над поставленной в диссертации проблемой и не влияют на высокую оценку содержания работы, достоверность полученных результатов и сделанных на их основе выводов.

Результаты работы могут быть использованы в исследованиях организации геномов и регуляции экспрессии как отдельных генов, так и регуляторных каскадов, влияющих на развитие и старение живых организмов, которые проводятся в профильных институтах и университетах Российской Федерации, в частности, в Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН, Институте биологии гена РАН, Институте биологии развития РАН, Институте белка РАН, Институте молекулярной биологии РАН и Институте биоорганической химии РАН. Полученные данные также могут быть использованы при составлении курсов лекций по генетике, биохимии, геронтологии и молекулярной биологии, а также для решения прикладных задач в области продления жизни и влияния на регуляцию развития, эмбрио- и нейрогенеза живых организмов и человека.

Заключение

Диссертационная работа Симоненко Александра Владимировича «Роль генов *escargot* и *shuttle craft*, кодирующих нейрональные транскрипционные факторы, в контроле продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*», является оригинальной научно-

квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. В работе использованы самые современные генетические методы. Несомненными являются новизна, наглядность полученных результатов и обоснованность выводов работы. Основные результаты работы опубликованы в престижных журналах. По поставленным задачам, уровню их решения и новизне полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Симоненко Александр Владимирович, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности по специальности 1.5.7. Генетика.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании семинара Отдела структуры и функции хромосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук 25 сентября 2023 года (протокол № 4).

Ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной
и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук
доктор биологических наук,
Колесникова Татьяна Дмитриевна

Адрес: 630090, город Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, дом 8/2

Тел.: +7 (383) 373-02-49

Эл. адрес: kolesnikova@mcb.nsc.ru

