

## Отзыв официального оппонента

на диссертацию Миляевой Полины Андреевны «Регуляция экспрессии мобильных элементов в соматических и генеративных тканях у *Drosophila melanogaster*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика.

Диссертационная работа Полины Андреевны Миляевой посвящена проблеме регуляции экспрессии мобильных генетических элементов (МГЭ), или более глобально – проблеме стабильности генома. Эта проблема имеет много составляющих, представленных эволюционным происхождением и особенностями репликации разных классов МГЭ, механизмами их интеграции в геном, сохранения и/или деградации, структурной организации в виде кластеров или одиночных копий, в случайных областях хромосом или в прицентромерных и теломерных участках хромосомы. Но этот перечень касается только эндогенных, или собственных характеристик автономных МГЭ, тогда как задача анализа механизмов регуляции усложняется целым пластом регуляторных взаимодействий, связанных с инактивацией транскриптов МГЭ взаимодействием со специфическими белковыми комплексами с *piwi*-взаимодействующими РНК (*pi*РНК). Соответственно, добавляется и уровень регуляции экспрессии кластеров *pi*РНК, экспрессии самих белков, составляющих соответствующие комплексы и уровень инициации сборки самих комплексов. Учитывая, что при этом осуществляется генетическая и эпигенетическая тканеспецифическая регуляция экспрессии всех составляющих, и регуляция, зависящая от онтогенетической стадии и от внешних условий (стресс-индуцированная), решение такой задачи имеет явно нетривиальный характер.

Представленное исследование выполнено в русле разрабатываемой на кафедре генетики МГУ темы под общим руководством Александра Иннокентьевича Кима, посвященной генетическим и геномным особенностям явления геномной нестабильности. Работа выполнена на классическом объекте генетики – *D. melanogaster*, на линиях со столь же классическим фенотипом *flamenco*, демонстрирующим повышенную транспозиционную активность МГЭ. Цель исследования Полины Андреевны однозначно определена в названии работы – анализ механизмов регуляции экспрессии МГЭ. Для достижения поставленной цели автор решает следующие задачи: определить связь фенотипа *flamenco* с экспрессией МГЭ и кластеров *pi*РНК в различных тканях самок дрозофилы и ЦНС личинок, определить влияние нокдаунов генов *rhino* и *piwi* на экспрессию МГЭ и кластеров *pi*РНК в тканях самок дрозофилы, определить изменение экспрессии МГЭ и кластеров *pi*РНК в тканях самок дрозофилы в условиях окислительного и теплового стресса, и определить влияние на стресс-

индуцированную и тканеспецифичную экспрессию МГЭ их геномной локализации, генетического окружения и состава последовательностей 5'-нетранслируемых областей МГЭ.

Все полученные результаты являются новыми и оригинальными, особый интерес вызывают данные по роли гена *piwi* в регуляции экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях. Следует отметить также вывод о значении структуры регуляторных областей транспозонов при оценке различий активности их тканеспецифичной экспрессии и изменении активности при стресс-индуцированной экспрессии. Этот вывод предполагает, что регуляторное действие транскрипционных факторов в случае стресс-индуцированной и тканеспецифичной экспрессии МГЭ оказывается более эффективным, чем эффект siРНК-интерференции.

Актуальность представленных результатов связана как с востребованностью фундаментальных научных знаний о механизмах контроля геномной нестабильности, так и с их прикладной значимостью. Значимость для фундаментальных знаний связана с существенной ролью геномной нестабильности в представлениях о механизмах эволюции, формировании симбиотических отношений и «одомашнивании» ретровирусов, формировании клеточного гомеостаза и множестве иных направлений общей биологии. Прикладная значимость связана в первую очередь с ролью геномной нестабильности в процессах канцерогенеза, с прогностической значимостью активности разных классов транспозонов и новых сайтов их интеграции в эффективности различных стратегий терапии соответствующих опухолей.

Диссертация занимает 152 страницы текста, включая 34 страницы «Приложения». Приведены 186 литературных источников, диссертация проиллюстрирована 35 рисунками и 5-ю таблицами. Диссертация имеет стандартную структуру, представленную главами: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» из 186 источников и «Приложение».

«Обзор литературы» представлен на 35-и страницах и включает семь разделов. В первых двух частях обзора Полина Андреевна приводит классификацию МГЭ и данные по их общим характеристикам, механизмам транспозиции и специфичности встраивания в геном новых копий. В третьей части обзора представлена система siРНК-интерференции, подавляющая неконтролируемую активность МГЭ в соматических тканях, на примере исследований, проведённых на *D. melanogaster*. Показаны стадии формирования siРНК, состав и механизм действия RISC-комплекса, возможности прямой репрессии экспрессионной активности генов на уровне посттрансляционной модификации иРНК и

эпигенетической регуляции экспрессии генов путем метилирования гистонов в местах локализации ретротранспозонов.

В четвертой части Полина Андреевна представляет механизм piРНК-интерференции, действующий в генеративных тканях самок дрозофил – в яичниках. Автор приводит данные по источникам piРНК - кластерам ретротранспозонов, их структуре и особенностям экспрессии с канонических и неканонических сайтов. Показана роль комплекса RDC в экспрессии РНК-предшественника piРНК с гетерохроматиновых кластеров, и на рис.5 показана возможная роль piwi-piРНК комплексов в установлении гетерохроматиновых меток на соответствующих кластерах. Показан механизм экспорта из ядра различных вариантов piРНК, полученных с канонических и неканонических сайтов транскрипции. Детально рассмотрены механизмы биогенеза piРНК, полученных с канонических и неканонических сайтов, состав белковых комплексов, принимающих участие в процессинге предшественников piРНК и функциональная активность белков в составе комплекса, финальный транспорт в ядро, механизмы формирования комплекса с piwi и подавления активности транспозонов на стадиях транскрипции и посттранскрипционных изменений. Достоинством этой части обзора является анализ всех известных компонентов путей формирования piРНК и путей реализации их функциональной активности. В дальнейшем автор в собственной работе будет анализировать тканеспецифичную транскрипционную активность генов, кодирующих значительную часть описанных белков, для ее сопоставления с экспрессионной активностью транспозонов в данных тканях.

В пятом и шестом разделах Обзора литературы Полина Андреевна обсуждает механизмы активации ретротранспозонов и клеточного ответа на стресс. Приведены данные по формированию геномного стресса и дерепрессии МГЭ под действием гибридного дисгенеза, теплового и оксидативного стресса. Показана связь уровня экспрессии и транспозиционной активности МГЭ с их копийностью и генетическим окружением, влияние общего геномного контекста и структуры нетранслируемых областей самих транспозонов. Показана также половая и тканевая специфичность экспрессии транспозонов. Обсуждается активация специфических сигнальных каскадов в клетке в ответ на стресс, приводятся данные последних исследований по влиянию стресса на систему piРНК-интерференции. В последнем, седьмом разделе Полина Андреевна показывает наличие компонентов системы piРНК-интерференции в соматических тканях *D. melanogaster*. В данном разделе информация приведена более широко – для дрозофилы, нематод и человека, в последнем случае, для нормальной ткани и при канцерогенезе. Направление исследований, связанное с анализом piРНК-интерференции в соматических тканях, разрабатывается менее 10 лет, и основные результаты для дрозофилы и *C. elegans* получены преимущественно для ранних

стадий эмбриогенеза и развития нервной системы, и для некоторых вариантов опухолей у человека. Резюмируя, автор справедливо отмечает, что рiРНК-интерференции в соматических тканях может быть участником ответа на стресс.

В главе «Материалы и методы» приведена информация по используемым в исследовании линиям дрозофил и условиям их содержания, методам сбора образцов и выделения ДНК и РНК. Приведены протоколы получения кДНК и количественной ПЦР, подготовки ДНК-библиотек для нанопорового секвенирования. Описаны методы аллель-специфичной ПЦР и оценки копийности МГЭ. Приведены программы и базы данных, используемые для биоинформатического анализа результатов секвенирования, поиска инсерций МГЭ, сайтов связывания транскрипционных факторов в некодирующих последовательностях транспозонов. Для всех методов, включающих использование ПЦР, приведены праймеры к искомым вариантам последовательностей. **К данному разделу есть замечание** – в таблице 2 допущены опечатки по структуре аллель-специфичных праймеров к четырем генам (строки 4-7 таблицы). Использованный автором материально-методический аппарат полностью адекватен поставленным задачам.

Глава «Результаты» представлена четырьмя разделами. Первый раздел соответствует трем первым задачам – влиянию фенотипа *flamenco* на тканеспецифичную экспрессию МГЭ и кластеров рiРНК, и влиянию на эту экспрессию нокдаунов *rhino* и *piwi*. Второй раздел соответствует четвертой задаче – оценке влияния окислительного и теплового стресса на экспрессию МГЭ и кластеров рiРНК. Третий раздел соответствует пятой задаче – анализу влияние геномной локализации копий ДКП-ретротранспозонов на их тканеспецифичную и стресс-индуцированную экспрессию, и четвертый раздел соответствует последней задаче – поиску консервативных регуляторных последовательностей в составе 5'-нетранслируемых областей ДКП-ретротранспозонов.

В составе первого раздела имеется пять подразделов, и в первый Полина Андреевна включила данные по поиску генетической изменчивости, определяющей фенотип *flamenco*. Учитывая высокую изменчивость некодирующих последовательностей генома, и в большинстве случаев невозможность интерпретации выявленных полиморфизмов, а также сложность интерпретации синонимичных замен в кодирующих последовательностях, автор ограничилась поиском однозначно интерпретируемых полиморфизмов кодирующих последовательностей генома. С этой целью были проанализированы транскриптомы линии SS с фенотипом *flamenco*, производной от нее линии MS и линии Д32 дикого типа, и выявлены полиморфизмы по нонсенс-мутациям и миссенс-мутациям, приводящим к потере стоп-кодона. Выявленные мутации были проверены методом аллель-специфичной ПЦР и ни одна из них не была общей для линий SS и MS, и отличающей их от линии Д32. Это

достаточно очевидный результат для нонсенс-мутаций, так как фенотип *flamenco* надежно воспроизводится обеими линиями, что предполагает гомозиготное состояние аллеля или аллелей, приводящих к такому фенотипу. **Замечание к данному подразделу** – в таблице 5 отсутствуют подтабличные подписи, что затрудняет понимание некоторых строк, использующих характеристику «нет замен» для всех 4-х анализируемых линий. Вероятно, автор имеет в виду, что обнаруженный полиморфизм по данному локусу в линиях по результатам секвенирования транскриптома, не подтвердился аллель-специфичным ПЦР. В этом случае интересно выяснить, сколько мух бралось для получения образца РНК в обоих случаях, и чем могут быть вызваны отмеченные различия, по мнению автора.

Во втором подразделе первого раздела приведены результаты анализа экспрессионной активности пяти ДКП-ретротранспозонов и четырех теломерных LINE-элементов в тканях яичников, корпуса, головы и нервных ганглиев личинки, в линиях SS и Canton-S. Сходным образом приведена активность экспрессии различных кластеров рiРНК (*flamenco* и 42AB – сплайсированных и несплайсированных форм, 38C1, 38C2 и 20A) в тех-же тканях и линиях дрозофил. Линия Д32 использована в качестве дополнительного контроля и наиболее яркие и значимые результаты подтверждены и на этой линии дикого типа. Во всех случаях в качестве контрольного образца для сравнения показателей относительной экспрессии в тканях Полина Андреевна использует показатели экспрессии в яичниках. Также сравнения между показателями относительной экспрессии проводятся только между разными тканями в пределах одной линии, учитывая возможные различия в линиях по количеству и положению в геноме соответствующего МГЭ. Автор делает вывод об отсутствии значимых отличий в экспрессии ДКП-ретротранспозонов между линиями с фенотипом *flamenco* и линиями дикого типа, и появлении таких различий для LINE-элементов *HeT-A* и *TART-A*. Полина Андреевна отмечает исключение, сделанное для ретротранспозона *Tirant* – этот МГЭ накапливается в яичниках линии дикого типа. Для кластеров рiРНК картина более сложная – двуцепочечный кластер 42AB различается между линиями по уровню экспрессии несплайсированных форм в яичниках (линия SS), тогда как одноцепочечный кластер *flamenco* накапливает в яичниках самок и нервной системе личинок именно сплайсированные формы. Для несплайсированных форм рiРНК у одноцепочечного кластера 20A у линии SS высокая экспрессия в тканях имаго, тогда как у линии Canton-S – в ЦНС личинок. В отношении экспрессионной активности транспозонов вывод, сделанный Полиной Андреевной, справедлив, когда уровень экспрессии в яичниках является базовым для сравнений. Он касается сходного для обеих линий значимого падения экспрессии ДНК-ретротранспозонов в яичниках по сравнению с соматическими тканями. По размаху изменчивости показателей экспрессии и представленным их медианным значениям видно,

что при использовании уровней экспрессии транспозонов в корпусе или голове, мы получим значимые различия между линиями уже по экспрессии в соматических тканях ретротранспозонов *blood* и *copia*. **Замечание к этому подразделу** – в подрисуночных подписях необходимо указывать ткань (образец, выборку), используемую в качестве базовой для сравнения, указывать, какие данные приведены – средние или медианы, ошибки среднего или квартили, указывать метод, используемый при определении значимости различий. Учитывая небольшое количество образцов в выборке, в соответствии с информацией из главы «Материалы и методы», и асимметричностью планок погрешностей на диаграммах, данные представлены в виде медианы и верхнего и нижнего квартилей. Возможно, эта информация представлена главе «Материалы и методы», но я ее не нашел.

В третьем подразделе приведены данные по экспрессии генов, участвующих в рiРНК-интерференции. Оценки выполнены на образцах из линии Canton-S, учитывая отсутствие отличий между линиями SS и дикого типа по экспрессии генов, участвующих в рiРНК-интерференции, в соответствии с полученными ранее данными анализа транскриптомов этих линий. Получен интересный результат – у нескольких генов отсутствует экспрессия в тканях головы (*cuff*, *VoYb*, *zuc*, *vasa*), а у остальных наблюдается непропорциональное изменение экспрессионной активности в разных тканях. Это предполагает существенные различия в составе и количестве в разных тканях белковых комплексов, участвующих в рiРНК-интерференции. **Здесь необходимо сделать маленькое замечание** автору за скромность – проведена и представлена большая работа по оценке тканеспецифичной экспрессии генов, участвующих в рiРНК-интерференции. Проведено сравнение показателей экспрессии этих генов с экспрессионной активностью транспозонов в соответствующих тканях. Эту задачу следовало представить в виде самостоятельной задачи, и сделать вывод по имеющимся результатам о различиях в составе белковых комплексов, участвующих в рiРНК-интерференции, в различных тканях дрозофилы.

В четвертом и пятом подразделах приведены результаты анализа влияния двух центральных компонентов рiРНК-интерференции – белков *rhino* и *piwi*, на экспрессию МГЭ и кластеров рiРНК в тканях самок имаго и личинок. Были использованы линии с нокдауном гена *rhino* и с аллелями гена *piwi* с нарушенной функцией белка. Полученные результаты подтвердили рост экспрессии МГЭ *HeT-A*, *TART-C*, *gypsy* и *copia* в тканях яичников и корпуса в линии с нокдауном *rhino*, *TART-B* – во всех тканях, *TART-A* – в тканях головы, *blood* – небольшой но значимый рост только в яичниках, *Tirant* – падение экспрессии в тканях корпуса и *roo* – рост экспрессии в яичниках падение в тканях корпуса. Отсутствие *rhino* отражается на экспрессии двухцепочечных кластеров рiРНК. Учитывая наличие в геноме обоих типов кластеров, действие нокдауна *rhino* неоднозначно – *flamenco*

экспрессируется исключительно в яичниках, и наблюдается рост его сплайсированной формы (хотя и не должен), кластер *42AB* проявляет повышенную экспрессию сплайсированной формы во всех тканях, и несплайсированной – в тканях корпуса. При этом одноцепочечный кластер *piRNA flamenco 11620* не меняет свою экспрессию. Остальные кластеры показывают слабое или незначимое изменение активности экспрессии и даже ее падение (*38C\_2, 20A*). Полина Андреевна делает вывод о возможности для некоторых транспозонов в отсутствие *rhino* действия механизма *siRNA*-интерференции через перенаправление неправильно сплайсированных транскриптов, что приводит к снижению экспрессии этих МГЭ. Автор также обсуждает возможность эволюционных изменений кластера *flamenco* через инсерции МГЭ в противоположной ориентации, что может привести к возможности регуляции экспрессии кластера как двухцепочечного, чувствительного к влиянию *rhino*.

Белок *piwi* участвует в формировании комплекса с *piRNA* на последней стадии, и таким образом оказывает влияние как на одноцепочечные, так и на двухцепочечные кластеры *piRNA*. Тем не менее, общая картина зависимости экспрессии МГЭ и кластеров *piRNA* от *piRNA*-интерференции не подтверждается. В экспериментах использованы два аллеля *piwi*, различающиеся степенью нарушения функциональной активности белка. Оценки влияния этих аллелей на экспрессию МГЭ и кластеров *piRNA* получали для компаундов из реципрокных скрещиваний, относительно гетерозиготного генотипа на балансирной хромосоме с нормальным аллелем *piwi*. В тканях яичников экспрессия транспозона *roo* растет у обоих вариантов компаундов, у транспозонов *gypsy* и *coria* – только у одного из компаундов. LINE-элементы в тканях яичников не показывают зависимости экспрессии от генотипа *piwi* (*TART-A, B, C*), или снижают экспрессию у компаундов (HeT-A). Экспрессия транспозонов в соматических тканях сохраняется прежней только для *gypsy*, причем растет у обоих компаундов относительно гетерозиготного генотипа. Изменения экспрессии HeT-A незначимы, у всех остальных транспозонов экспрессия у компаундов снижается относительно гетерозиготного генотипа. Рост экспрессионной активности кластеров *piRNA* в яичниках самок *piwi[2]/piwi[3]*, показан только для сплайсированных форм *piRNA* кластера *42AB*. Экспрессионная активность кластеров *38C1, 38C2, 20A* и несплайсированной формы *piRNA* кластера *42AB* не меняется на фоне *piwi[2]* вне зависимости от второго аллеля, и значимо снижается у кластера *flamenco* у компаундов по двум аллелям *piwi*. В соматических тканях экспрессия кластеров в основном сохраняется такой, как в яичниках. Небольшой, но значимый рост активности показан для кластеров *38C2* и *20A* у компаундов *piwi[2]/piwi[3]*, в тканях корпуса и головы соответственно, и падение – для кластеров *38C1* и *20A* у компаундов *piwi[3]/piwi[2]* в тканях головы. **Вопрос к**

**Полине Андреевне по представленным данным** – что происходит в соматических тканях с кластером *flamenco* у компаундов по мутантным аллелям *piwi*?

Это безусловно новые и интересные результаты. Но не самые удивительные. А самые – касаются экспрессии ретротранспозонов TART у компаундных *piwi[2]/piwi[3]* и гетерозиготных по балансерной хромосоме *piwi[2]/piwi[+]* самок. Гетерозигота *piwi[2]* с нормальным аллелем *piwi[+]* на балансерной хромосоме вообще не имеет экспрессии ретроэлементов *TART-B* и *TART-C*, тогда как компаунд с двумя разными мутантными аллелями *piwi[2]/piwi[3]* начинает экспрессировать оба теломерных ретротранспозона на уровне, соответствующем гетерозиготе *piwi[3]/piwi[+]*. То есть, в гетерозиготе аллель *piwi[2]* не работает, а нормальный аллель *piwi[+]* вообще полностью блокирует экспрессию элементов *TART-B* и *TART-C*. При этом у компаундов, полученных из реципрокного скрещивания, и у гетерозигот *piwi[3]/piwi[+]* уровень экспрессии этих ретротранспозонов не различается. Можно предположить, что перед нами очень интересный и неодинаковый эффект взаимодействия мутантных аллелей *piwi* с нормальным аллелем, или конкурентное взаимодействие мутантных и нормальной форм белка *piwi* с партнерами SFiNX комплекса. И хочется надеяться, что автор предпримет дальнейшее развитие этого направления.

Во втором разделе Полина Андреевна представляет результаты экспериментов по влиянию стресса на экспрессию транспозонов. Подобрана близкая к полулетальной концентрация борной кислоты (1%), являющейся нейропаралитическим ядом и вызывающей окислительный стресс у насекомых, приводящий к гибели 33% мух из линии SS и от 54% до 77% мух из контрольных линий. Проведена проверка связи устойчивости к стрессу и изменчивости цитохрома *Cyp9b1*, гена-паралога цитохрома *Cyp9b2*, обеспечивающего 50% рост устойчивости к борной кислоте. В простом, но изящном генетическом эксперименте доказано отсутствие связи аллельного полиморфизма *Cyp9b1* и устойчивости к борной кислоте. Анализ экспрессионной активности этих двух цитохромов показал связь повышенной экспрессии *Cyp9b2* в линии SS и ее более высокой устойчивости к борной кислоте. Кроме этого, для всех испытуемых линий по уровню экспрессии трех генов маркеров окислительного стресса получено подтверждение высокого уровня стресса под действием другого окислителя – персульфата аммония (АПС). Оценка уровня экспрессии 4-х ДКП-ретротранспозонов под влиянием окислительного стресса показала рост экспрессии МГЭ у мух линии SS во всех случаях, и сохранение высокого уровня экспрессии у *gypsy* и *Tirant* в течение 24-48 часов. Линия дикого типа Canton-S показывает значимое и постоянное падение экспрессии транспозона *gypsy* после окислительного стресса (рис.29). Это предполагает более высокую чувствительность этой линии к окислительному стрессу. И что важно – что два гена-маркера окислительного стресса из трех показали падение уровня



экспрессии до нормы через 48 часов после стресса, а третий – также резкое падения до уровня, незначительно превышающего норму в отсутствие стресса. Вопрос – как получено значение n.s. для Canton-S 48 часов после АПС – там должно быть значение 0.001 и ниже. Остальные транспозоны показывают длительный (до 48 часов) и значимый рост экспрессии в линии Canton-S после АПС.

Условия длительного теплового стресса не приводят к заметным изменениям экспрессионной активности *copia* и *springer* в линии SS, в линии Canton-S у элемента *copia* экспрессия растет, до значимых отличий через 24 часа после стресса, у элемента *springer* – значимое падение экспрессии в момент стресса, и частичное восстановление через 24 часа. У транспозона *gypsy* активность экспрессии растет в обеих линиях через 24 часа после стресса, а у *Tirant* – с момента стресса в обеих линиях. Оценка динамики экспрессии кластеров после АПС в наиболее подверженной окислительному стрессу линии Canton-S показала устойчивый рост экспрессии кластеров flamenco и 42AB, падение экспрессии с последующим восстановлением для элементов 20A и 38C1, и отсутствие значимых изменений для транспозона 38C2. Автор делает вывод, что нет сходного изменения экспрессии разных кластеров в ответ на стресс. Отмечу, что рост экспрессии кластеров flamenco и 42AB в линии Canton-S соответствует падению экспрессии транспозона *gypsy* и противоречит росту экспрессии остальных транспозонов в этой линии.

В третьем разделе главы Результаты приведены данные экспериментов, направленных на оценку влияния количества копий ретротранспозонов заданного типа и их локализации в геноме на экспрессию в различных тканях и во время стресса. Методом количественной ПЦР было оценено число копий в линиях Canton-S и SS четырех элементов – *gypsy*, *copia*, *Tirant* и *springer*. Количество копий элементов *copia* и *Tirant* в линиях различалось. Различие в одну копию малокопийного *Tirant* не имело значимого влияния на экспрессию этого элемента. Различие в 20% в числе копий ретротранспозона *copia* было связано с более высокой экспрессией этого элемента в линии Canton-S с бóльшим количеством копий, но различие в уровне экспрессии не пропорционально различию в числе копий. Развитие геномного стресса также приводит к различным уровням изменения экспрессии МГЭ в разных линиях. Автор делает вывод о неэффективности нормирования экспрессии МГЭ на число копий.

Для анализа влияния локализации на активность экспрессии МГЭ Полина Андреевна на референсном геноме *D. melanogaster* отфильтровала все копии МГЭ *copia*, *roo*, *gypsy*, *Tirant*, *blood*, которые могли быть амплифицированы с использованием представленных праймеров. Следовало проверить две гипотезы – (1) линии различаются по инсерциям в последовательностях экспрессируемых генов, и (2) одинаковые гены по составу инсерций в сравниваемых линиях резко различаются по уровню экспрессии в зависимости от стресса

или от тканевой специфичности. Были отфильтрованы копии МГЭ, встроенные коллинеарно с направлением экспрессии гена-мишени. По базе данных FlyBase был проведен анализ экспрессионной активности генов мишеней в ответ на стресс и анализ тканевой специфичности экспрессии. При проверке гипотез в обоих случаях было показано, что только единичные копии МГЭ расположены в генах, экспрессирующихся тканеспецифично или в ответ на стресс. Более того, специфичность экспрессии гена в определенной ткани не исключала повышенную экспрессию транспозона, имеющего расположенную в нем копию, и в другой ткани. Для двух копий *Tirant*, расположенных в генах *cactus* и *Nuak*, по-разному меняющих экспрессию при тепловом стрессе, был проведен экспериментальный анализ зависимости экспрессии транспозона от экспрессии гена, в котором он расположен. Анализ не подтвердил такой зависимости. Исходя из всех полученных результатов, автор заключает, что корреляция между положением МГЭ в геноме и активностью его экспрессии нет значимой зависимости. **К этой части Результатов** есть несколько вопросов. 1. Страница 89, первый абзац. На основании выявленных делеций (вероятно, в кодирующих последовательностях, что следовало указать) большинства копий МГЭ автор делает вывод, что «любая лабораторная линия обладает полиморфизмом по большинству инсерций МГЭ». Учитывает ли автор длительность содержания линий и изогенизацию нейтральных полиморфизмов? 2. Страница 90 предпоследний абзац. «..значительная часть этих инсерций находится в межгенном пространстве и все инсерции гетерозиготны». Как Вы объясняете гетерозиготность ВСЕХ инсерций? Уже в первом поколении после создания линии, если оба родителя полностью гетерозиготны, будет расщепление, и число гомозигот по каждому локусу будет примерно соответствовать числу гетерозигот. Для одной мухи это будет значить, что примерно половина наблюдаемых инсерций будет гомозиготна по одному из аллелей. 3. В Приложении 2, в таблице, 12-я строка. *Lasr*, CG43954. В ячейках повторяются, через запятую, одни и те же показатели активности экспрессии. В других строках таблицы этого нет. Это что-то значит, или опечатка?

Последний раздел результатов посвящен анализу выявленных сайтов связывания транскрипционных факторов (ТФ) в некодирующих областях МГЭ. Это закономерный этап исследований, учитывая, что анализ экспрессионной активности МГЭ, кластеров рiРНК и «генов-хозяев» для копий МГЭ не показал причины наблюдаемого паттерна экспрессии МГЭ в разных тканях и изменения паттерна в условиях стресса. Все некодирующие последовательности МГЭ были проанализированы на содержание мотивов связывания с ТФ. На выровненных для каждого типа МГЭ некодирующих последовательностях проведено сравнение локализации сайтов связывания ТФ, и определен набор консервативных сайтов. Показано, что для транспозонов с высокой копийностью характерно наличие сайтов

связывания как стресс-индуцируемых ТФ, и независимых от стресса ТФ. Автор отмечает, что ряд вопросов, связанных с несоответствием паттерна экспрессии МГЭ определенного типа и представленных у него консервативных сайтов связывания ТФ, остался открытым. Это подтверждает сложность анализируемой многокомпонентной системы регуляции активности МГЭ.

Завершает работу глава «Обсуждение», в котором в четырех разделах, соответствующих разделам главы «Результаты», Полина Андреевна кратко воспроизводит основные выводы по каждому исследованию, и отмечает не имеющие объяснения противоречия полученных результатов, требующие усложнения модели предполагаемых механизмов регуляции активности транспозонов. Собственно, в этом и состоит логика любого исследования – найти противоречия в описании механизмов, объясняющих изучаемое явление, усложнить или изменить модель и устранить противоречия. На каждом этапе исследования Полина Андреевна показывала несоответствие наблюдаемого паттерна показателей интенсивности экспрессии МГЭ и ожидаемого паттерна на основании показателей экспрессии участников системы, регулирующей экспрессию МГЭ. Безусловно, часть этих противоречий может быть устранена в исследованиях на уровне белковой химии, анализа формирующихся тканеспецифичных регуляторных комплексов, подтверждения возможности взаимодействия ТФ с мотивами, представленными в данной области генома, иных эпигенетических механизмов. Но это далеко выходит за рамки данной поисковой работы, представившей интересные результаты и предложившей широкий спектр направлений для дальнейших исследований.

В «Заключении» Полина Андреевна перечисляет основные результаты, показывает функциональную значимость системы рiРНК-интерференции в соматических тканях, возможность взаимодействия составных частей систем рiРНК-интерференции и siРНК-интерференции. Автор подчеркивает, что активность мобильных элементов в ответ на стресс зависит от взаимодействия механизмов регуляции экспрессии, определяемых организацией регуляторных областей МГЭ и механизмов процессинга транскриптов кластеров системы рiРНК. Выявленные противоречия являются основой для дальнейших исследований разнообразных механизмов регуляции активности МГЭ. **Небольшое замечание к Заключению** – неудачная формулировка «...ТФ раннего эмбрионального развития и, соответственно, принадлежат путям ответа на окислительный и тепловой стрессы.». Транскрипционные факторы раннего эмбрионального развития не являются автоматически факторами ответа на стресс, хотя часть из них и имеет повышенную экспрессию при стрессе. Слово «соответственно» здесь неуместно.

Выводы работы хорошо согласуются с полученными результатами и соответствуют поставленным задачам. Представленная работа выполнена на солидном фактическом материале, убедительно обоснована и аргументирована, не имеет серьезных возражений по существу. Отмеченные погрешности не умаляют общего значения данной работы.

Автореферат представлен на 24-х страницах, полностью отражает содержание диссертации, хорошо оформлен и проиллюстрирован пятью рисунками.

П.А. Миляевой выполнено новое исследование в области эволюции геномов, той ее части, которая связана с исследованием роли мобильных элементов, механизмов их «одомашнивания», регуляции их активности и функциональной роли в жизни клетки. Показано, что контроль активности мобильных элементов осуществляется при потенциальном взаимодействии стандартных механизмов регуляции транскрипционной активности генов с участием транскрипционных факторов и механизмов регуляции с участием микроРНК. Показана роль рiРНК-интерференции в регуляции активности МГЭ в соматических тканях.

П.А. Миляева самостоятельно выполнила сбор материала, экспериментальные работы и провела анализ полученных данных. Полученный материал представлен в 5-и публикациях в изданиях, рекомендованных ВАК, и апробирован на 5-и Российских и международных конференциях. Работа П.А. Миляевой полностью соответствует п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика.

Официальный оппонент  
Куликов Алексей Михайлович  
Доктор биологических наук,  
Зам. директора Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН,  
Заведующий лабораторией эволюционной генетики развития  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 26  
Телефон: +7(499) 135-87-81, e-mail: amkulikov@gmail.com

Подпись А.М. Куликова заверяю:  
Ученый секретарь ИБР РАН

к.б.н.



М.Ю. Хабарова