

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертационной работе Полины Андреевны Миляевой «РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В СОМАТИЧЕСКИХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ ТКАНЯХ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7 – «генетика»

Актуальность исследования

Исследование роли мобильных элементов в организме и, в связи с этим, механизмов регуляции их экспрессии в последние годы вызывает все возрастающий интерес ученых. Перестал вызывать сомнение тот факт, что мобильные элементы являются участниками разнообразных и весьма важных процессов в эволюции, развитии и функционировании самых разнообразных живых существ. Однако, несмотря на высокую интенсивность исследований, многие вопросы, касающиеся генетического контроля транспозиций, особенностей различных мобильных элементов и их влияния на функции клетки и организма, остаются пока открытыми. Более того, появляются новые и неожиданные данные, свидетельствующие, например, об активности мобильных элементов и генов, регулирующих их поведение, в соматических тканях, и даже об ассоциации такой активности с рядом патологических состояний человека. В связи с этим диссертационная работа П. А. Миляевой представляется весьма актуальным и востребованным исследованием, вносящим достойный вклад в одну из наиболее динамично развивающихся областей молекулярной генетики.

Научная значимость и новизна исследования

Анализ механизмов регуляции экспрессии мобильных элементов – это обширная и сложная область исследования. Помимо того, что существует большое количество различных мобильных элементов, каждый из которых характеризуется своими особенностями, уже известно и множество систем регуляции их активности, влияние которых на отдельные мобильные элементы может быть разным. Большая часть деталей, а возможно, и общих принципов взаимодействия между мобильными элементами и их регуляторами остаются неясными. Результаты различных авторов часто трудно совместить, иногда они противоречат друг другу. В связи с этим трудно переоценить значение исследований, в которых тщательно собраны и проанализированы большие массивы конкретных данных, увеличивающих полноту наших знаний в этой области. Одно из таких исследований представлено в диссертационной работе П. А. Миляевой. В совокупности с другими работами в этой области, оно приближает нас к пониманию полной картины взаимодействия мобильных элементов с другими компонентами генома.

Различные проведенные П. А. Миляевой эксперименты показали, что уровень экспрессии ретротранспозонов и процессинг транскриптов кластеров рiРНК у дрозофилы определяется системой рiРНК интерференции не только в генеративных, но и в соматических клетках. Исследование рiРНК интерференции в соме – это новое и многообещающее направление изучения регуляции экспрессии и функции ретротранспозонов. Достаточно сказать, что дерегуляция белков Рiwi-пути ассоциирована с развитием нейродегенеративных заболеваний человека. Оригинальные данные, полученные П. А. Миляевой, продемонстрировали, что у модельного объекта, плодовой мушки, в

различных соматических тканях, в том числе, и в нервной системе, работа генов *piwi* и *rhino* влияет на экспрессию ретротранспозонов и кластеров рiРНК.

Большой интерес представляет проведенное в работе изучение возможных механизмов регуляции экспрессии ретротранспозонов, зависящей от типа ткани и внешних стрессовых воздействий. Полученные данные указывают на роль специфических транскрипционных факторов в определении поведения конкретных ретротранспозонов. Впечатляет тот факт, что транскрипционные факторы могут специфически действовать, например, в яичниках и, вместе с тем, в центральной нервной системе личинки. Именно это и может объяснить связь между изменением экспрессии ретротранспозона в яичниках и в ходе развития.

Очень изящное исследование позволило П. А. Миляевой оценить, связано ли изменение экспрессии ретротранспозонов при стрессе с тем, что они расположены в районах локализации генов, отвечающих на стресс, и транскрибируются вместе с ними. Сочетание полногеномного анализа локализации ретротранспозонов в исследованных линиях и анализа экспрессии отдельных копий ретротранспозона *Tirant* показало, что ретротранспозоны реагируют на стресс самостоятельно. Этот оригинальный результат, безусловно, украсил диссертационную работу.

Структура работы, достоверность и обоснованность научных результатов

Диссертация построена по стандартному плану. Кратко и четко написанное «Введение» (первая глава) включает стандартный набор рубрик, доказывающих актуальность темы исследования, описывающих степень ее разработанности, формулирующих цель и задачи диссертационной работы и положения, выносимые на защиту, характеризующих новизну и практическую ценность полученных результатов и вклад автора в проведенные в исследования, и ряд других.

Вторая глава представляет собой обзор научной литературы по теме диссертационной работы и состоит из семи разделов. В первых двух дана общая характеристика мобильных элементов, в первую очередь, ретротранспозонов. Пять других разделов посвящены рассмотрению вопросов, связанных с темой диссертационной работы. «Обзор Литературы» содержит значительное количество информации, рисунков, написан логично и понятно.

Третья глава «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных в работе линий дрозофилы и методов исследования. Набор освоенных и примененных в работе методов свидетельствует о хорошей квалификации П. А. Миляевой как ученого-генетика.

В четвертой главе изложены собственно результаты работы. Два объемных раздела этой главы посвящены исследованию эндогенных (генетических) и экзогенных (стрессовых) влияний на уровень экспрессии ретротранспозонов и кластеров рiРНК. В двух других разделах рассмотрено влияние числа и положения в геноме копий мобильных элементов, а также структуры их регуляторных областей на уровень их экспрессии. Последовательность и полнота изложения полученных данных в целом заслуживают высокой оценки. Все результаты работы подробно иллюстрированы рисунками и таблицами, включая таблицы «Приложения», в которых приведены первичные данные опытов, что позволяет во всей полноте оценить качество и объем экспериментальной части работы. Достоверность полученных данных не вызывает сомнения. Остановлюсь чуть подробнее на важном вопросе о линии – адекватном контроле для линии SS, который не раз обсуждался ранее с коллегами П. А. Миляевой. В отсутствие такого контроля очень трудно оценить влияние фенотипа *flamenco* на эффекты различных факторов, затрагивающих экспрессию ретротранспозонов.

Использованный П. А. Миляевой подход позволяет оценивать эффекты *flamenco* в линии SS по изменению уровня экспрессии ретротранспозонов в соматических тканях по сравнению с яичниками, в сопоставлении с аналогичными изменениями в линии Canton S. Этот подход является достаточно удачным, однако описание результатов и их интерпретация требуют большей аккуратности, и в целом автору диссертационной работы удалось этого добиться.

В Главе 5 «Обсуждение» П. А. Миляева рассматривает и обобщает результаты своего исследования. Завершают работу главы «Заключение» и «Выводы», подводящие итог проделанной работе. «Список литературы» включает 186 научных работ.

В целом, диссертация П. А. Миляевой отличается тщательностью и продуманностью экспериментов и оригинальностью подходов, предложенных для решения поставленных задач. Достойный научный уровень диссертационной работы не исключает отдельных замечаний, относящихся к сути некоторых экспериментов и характеру изложения.

Количество различных ретротранспозонов очень велико. Хотелось бы увидеть более убедительное объяснение, почему в качестве «модельных» ретротранспозонов для анализа были выбраны именно те, которые использованы в работе. Ведь разные классы ретротранспозонов представлены неравномерно, а среди LINE выбраны только теломерные. Почему набор «модельных» ретротранспозонов немного изменили при исследовании стресса? Поскольку в ряде случаев результат исследования определяется конкретным ретротранспозоном, выбор «моделей» важен для получения полной и объективной картины.

Рисунок 23 свидетельствует о том, что у особей, гетероаллельных по мутациям *piwi*, снижается экспрессия *copia*, а также TART-A, B и C, причем двух последних – в зависимости от направления скрещивания, в котором были получены гетероаллельные комбинации. Казалось бы, дисфункция *piwi* должна приводить к увеличению экспрессии ретротранспозонов. Почему в этих случаях эффект обратный? Почему он может зависеть от направления скрещивания?

Почему в исследовании влияния стресса на экспрессию кластеров рiРНК не смотрели на сплайсированные формы в кластере *flamenco*?

Опыты, описывающие изменение экспрессии индивидуальных копий ретротранспозона *Tirant*, были поставлены, исходя из предположения, что ген *Nuak* не отвечает на стресс. Однако оказалось, что его транскрипция в проведенных опытах меняется при стрессе. Почему так получилось? Этот вопрос стоило бы обсудить.

Название Рис 35 диссертации (Рис. 12 автореферата) не вполне отражает суть рисунка. Более корректным было бы, например, такое название: «Ткани, в которых функционируют стресс-индуцируемые транскрипционные факторы, имеющие потенциальные сайты связывания в 5' НТО ДКП-ретротранспозонов».

Второе предложение первого вывода сформулировано не вполне удачно. Речь, видимо, идет о том, количество рiРНК не увеличивается настолько, чтобы затронуть экспрессию ретротранспозонов.

Автореферат в целом хорошо соответствует диссертационной работе, однако текст его не всегда удачен из-за вынужденной краткости. Исчезли многие логические связки и объяснения, которые украшают текст диссертации, делая более понятным и обоснованным ход проведенной работы.

В автореферате для лучшего понимания работы стоило бы в нескольких словах упомянуть о системе GAL4-UAS или об индукции трансгена, кодирующего шпильку.

Отмечу также несколько недостатков в оформлении работы и технических ошибок.

Отсутствует расшифровка сокращения ДКП.

Рисунок 6 автореферата свидетельствует о том, что у особей, гетероаллельных по мутациям *piwi*, снижается экспрессия *coria*. Однако в описании рисунка в тексте написано, что она повышается.

На рисунке 23 диссертации видно, что у особей, гетероаллельных по мутациям *piwi*, экспрессия большинства LINE снижается, однако в описании рисунка в тексте написано, что она увеличивается.

В оглавлении две главы 5: «Обсуждение» и «Зключение».

Формат списка литературы не вполне соответствует требованиям. Названия генов, мобильных элементов и видов животных не всегда выделены курсивом.

Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии её требованиям ВАК

Суммируя все сказанное выше, считаю, что диссертационная работа Миляевой Полины Андреевны «Регуляция экспрессии мобильных элементов в соматических и генеративных тканях у *Drosophila melanogaster*» является актуальным, оригинальным, выполненным на хорошем научном и методическом уровне, завершённым научным исследованием. Выводы работы соответствуют полученным результатам, опубликованным в журналах из списка ВАК и представленным на различных научных конференциях. Содержание Автореферата в целом соответствует содержанию диссертации. Тематика диссертации полностью соответствует специальности 1.5.7 – «генетика». Результаты работы могут быть использованы в образовательных курсах по молекулярной биологии и генетике и в научно-исследовательской работе Институты и Университеты биологического и медицинского профиля. Они также могут послужить основой для практической разработки методов генотерапии, в том числе способов репрессии онкологических процессов. В целом диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор, Миляева Полина Андреевна, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – «генетика».

Пасюкова Елена Генриховна,
доктор биологических наук, профессор,
начальник лаборатории геномной изменчивости КК НБИКС-ПТ
ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

02 сентября 2024



/Пасюкова Е. Г./

Подпись Е. Г. Пасюковой заверяю
Главный ученый секретарь
НИЦ «Курчатовский институт»
Борисов Кирилл Евгеньевич



/Борисов К. Е./