

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Аси Генриковны ДАВИДЬЯН на тему: **«ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ SAUROPSIDA»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология

Диссертационная работа Аси Генриковны Давидьян посвящена малоисследованной теме – изучению особенностей организации генов 45S- и 5S рРНК у представителей филогенетической ветви Sauripsida (в частности, у птиц, крокодилов и черепах), а также изучению особенностей функционирования (транскрипции и амплификации) этих генов в оогенезе. Привлекательной особенностью диссертации является то, что полученные результаты обсуждаются в контексте эволюции структурно-функциональной организации районов кластеров генов РНК-компонента рибосом и их активности в оогенезе у позвоночных в целом. По тематике результаты представленного к защите исследования, несомненно, соответствуют научной специальности 1.5.23. «Биология развития, эмбриология». С использованием широкого спектра современных методов молекулярной цитогенетики, геномики, биоинформатики вопросы организации и функционирования генов рРНК в оогенезе Sauripsida ранее никогда не изучались, что, несомненно, делает представленную к защите работу современной и актуальной.

Представленная к защите работа А.Г. Давидьян представляет собой машинопись на 200 страницах А4, работа написана в двух равнозначных вариантах на русском и английском языках. Текст диссертации построен по традиционному плану: он состоит из Введения, 4-х глав, из которых 1-я – это обзор литературы, а 4-я озаглавлена «Заключение», Выводов, списка сокращений, главы «Благодарности» и раздела «Список литературы».

Во введении диссертант раскрывает свое видение актуальности предпринятого исследования и формулирует цели и задачи предпринятого исследования, которые состояли в том, чтобы

1. Исследовать морфологию яичника и цито-молекулярные особенности функционирования рибосомных генов в растущих ооцитах у неполовозрелых и половозрелых самок домашней курицы *G. gallus domesticus* (Aves, Galliformes) с использованием методов 3D-моделирования яичника, иммуногистохимии и гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*.
2. Исследовать цито-молекулярные особенности функционирования рибосомных генов в растущих ооцитах черепахи *T. scripta elegans* (Reptilia, Testudines) с использованием иммунофлуоресцентной цитохимии и гибридизации нуклеиновых кислот *in situ*.
3. Исследовать *in silico* структуру рибосомного повтора в геноме *T. scripta elegans*.

4. Исследовать особенности функционирования генов 5S рРНК в ооцитах *T. scripta elegans* с использованием методов молекулярной и клеточной биологии.

5. Провести сравнительно-эволюционный анализ стратегий функционирования ядрышкового организатора в оогенезе представителей Sauropsida.

Текст Введения написан ясным, литературным языком, и, с моей точки зрения, адекватно отражает актуальность предпринятого исследования.

В Обзоре литературы диссертант последовательно разбирает сложившиеся к началу XXI века «классические» представления о типах оогенезов у животных, об организации ядрышкового организатора и о функционировании генов рРНК в оогенезе птиц и рептилий, представления, вполне согласовавшиеся со взглядами молекулярных генетиков, цитологов и эмбриологов недавнего времени (Gaginskaya et al., 2009; Bermúdez et al., 2012; Koshel et al., 2016; Дондуа, 2018; Красикова, Куликова, 2020).

Далее в Обзоре литературы рассматриваются вопросы структурно-функциональной организации кластеров генов 45S- и 5S-рРНК и, в частности, обсуждается природа и роль межгенных спейсеров в кластерах рибосомных генов. Изложение имеющихся данных адекватно и достаточно подробно отражает современные представления об организации кластеров генов 45S рРНК позвоночных, текст Обзора литературы хорошо читается. Отмечу лишь один незначительный, но досадный недочет технического характера: на стр. 11 диссертант пишет: «...С. Г. Навашин (Navashin, 1934), Э. Хайц (Heitz, 1931) и Б. МакКлинток (McClintock, 1934) обнаружили связь между ядрышком и определенным локусом на хромосоме, который был описан МакКлинток как “ядрышковый организатор” (ЯОР)». В этом предложении почти все верно. Только надо было сослаться на статью С.Г. Навашина 1912 года (О диморфизме ядер в соматических клетках у *Galtinia sandicans*. Изв. Росс. Акад. наук. Сер. матем. 6(4), с. 373-385). Статья, на которую ссылается диссертант (Navashin, M. 1934. Chromosomal alterations caused by hybridization and their bearing upon certain general genetic problems // *Cytologia*. – 1934. – Vol. 5. – P. 169–203) написана сыном С.Г. Навашина, Михаилом Сергеевичем. В ней описано интереснейшее явление – амфипластия – изменения хромосом у гибридов, в сравнении хромосомами родительских видов, но ничего о связи ядрышка и вторичной перетяжки там, с моей точки зрения, не говорится.

Раздел Материал и методы в рецензируемой диссертационной работе имеет очень важное значение, поскольку наглядно показывает, что диссертант в ходе работы над диссертацией овладел самыми современными методами современной эмбриологии и биологии развития, начиная от таких экзотических, как микрохирургическое выделение ядер и хромосом из ооцитов птиц и рептилий разного возраста, до методов биоинформатики и методов приготовления гистологических препаратов для криомикротомы. В ходе работы диссертанту пришлось овладеть методами иммуноцитохимии, методами работы с геномной ДНК и РНК, методом гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* (FISH), методами количественной ПЦР, методами работы на эпифлуоресцентном и конфокальном лазерном сканирующем микроскопах и методами анализа полученных серийных изображений с использованием современного

программного обеспечения. В ходе решения задач, связанных с биоинформатикой, диссертант приобрел навык работы с базами данных нуклеотидных последовательностей, с транскриптомами.

Одно редакторское замечание. В разделе «Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) читаем: «Протокол FISH выполняли, как описано ранее (Давидьян и др., 2017; Davidian et al., 2021a; Keinath et al., 2021)» - мне кажется, что в этом разделе диссертации следовало бы привести детали эксперимента, поскольку разделы работы, описанные в «Давидьян и др., 2017; Davidian et al., 2021a; Keinath et al., 2021» - это совсем не то, что «описано ранее», а то, что как раз и представлено к защите.

Основной раздел работы, посвященный полученным диссертантом результатам и их обсуждению, показывает, что в ходе работы над диссертацией А.Г. Давидьян сделано несколько важных наблюдений, в той или иной степени меняющих наши представления о функционировании ядрышковых организаторов в оогенезе у птиц и совершенно новые данные о генетической композиции ядрышковых организаторов у птиц, черепах и крокодилов. В частности, А.Г. Давидьян показала, что сделанное около 50 лет назад заключение, что в ооцитах всех размеров у взрослых птиц из отряда Куриные гены 45S рРНК не транскрибируются и ядрышко не образуется следует пересмотреть. В ходе работы А.Г. Давидьян убедительно, с использованием иммуноцитохимии и FISH, показала, что в ооцитах как неполовозрелых, так и половозрелых самок птиц на стадии ранней диплотены есть одно или два ядрышка в составе которого выявляются РНК-полимераза I, фибрилларин, «незрелые» транскрипты рРНК. При этом подтверждено отсутствие амплификации рибосомных генов в растущих ооцитах домашней курицы и показана амплификация генов рРНК в растущих ооцитах черепах. Амплифицированные последовательности рДНК в ооцитах черепах входят в состав экстрахромосомных ядрышек, количество которых возрастает с ростом ооцита, что отличает черепах от рыб и амфибий, в ооцитах которых амплификация рДНК в ооцитах проходит в ранней пахитене.

Кроме этого, в работе А.Г. Давидьян впервые полностью расшифрована первичная последовательность генов и межгенных спейсеров локусов 45S рРНК бугорчатой черепахи *Malaclemys terrapin*, аннотированы последовательности межгенных спейсеров IGS рДНК *Trachemys scripta elegans*, *Carretochelys insculpta*, *Pelusios castaneus*, *Chelonoidis abingdonii*, *Dermochelys coriacea*, *Podocnemis expansa*, *Alligator sinensis* и *A. mississippiensis*. С точки зрения эволюционной геномики исключительно интересны полученные А.Г. Давидьян данные о молекулярной композиции межгенных спейсеров в кластерах генов 45S рРНК черепах, крокодилов и птиц. Диссертантом впервые показано, что в кластеры генов 45S рРНК крокодилов и черепах входят не только последовательности, кодирующие 18S-, 28S-, 5.8S-, но и расположенные на противоположной нити ДНК гены 5S-рРНК. Диссертантом показано, что первичная последовательность этих «перемещенных» генов 5S рРНК отличается от канонической. Последовательности этих необычно расположенных генов 5S рРНК амплифицируются вместе с последовательностями, кодирующими 18S-, 28S-, 5.8S рРНК и входят в состав рибосом ооцита на стадии вителлогенеза. Тем самым, впервые описан особый *ооцитный* тип 5S рибосомных генов в геномах крокодилов и черепах.

Эти результаты красиво обсуждены диссертантом и можно согласиться с мнением диссертанта, что особое расположение части генов 5S рРНК в геномах черепах и крокодилов, перенесение их в локус 45S рРНК (в один оперон с последовательностями

18S, 28S, 5.8S рРНК !) может быть простым механизмом, обеспечивающим равновесную амплификацию всех РНК-компонентов рибосом в ооците. И очень интересной представляется высказанная диссертантом гипотеза, о том, что особый вариант последовательностей тех генов 5S рРНК, которые переместились в ЯОР, в сравнении с каноническими генами 5S рРНК крокодилов и черепах, может быть следствием проявления (стать в будущем причиной появления?) новых, пока еще не изученных функций у этого варианта 5S рРНК в оогенезе рептилий или, шире, в онтогенезе рептилий, например, в специфической трансляции на разных рибосомах определенных мРНК.

Лишь один раздел работы, один промежуточный вывод, вызвал у меня замечание. На стр. 60 диссертации рассказано о результатах опыта, цель которого – ответить на важный вопрос, каким образом увеличивается число амплифицированных ядрышек в ооцитах черепах. Можно думать, что амплифицированные ядрышки могут возникать а) как результат многочисленных актов амплификации исключительно хромосомных копий 45S рДНК, б) как результат РНК-зависимой ДНК репликации пре рРНК транскриптов, и в) как результат каскадной репликации экстрахромосомных копий изначально хромосомных локусов 45S рРНК. Диссертант исследовал 3-й («в») из перечисленных 3-х вариантов. Она пишет (стр. 60): «Прогрессивное увеличение числа ядрышек с ростом ооцита поднимает вопрос о механизме их образования. Мы исследовали возможность репликации рДНК в экстрахромосомных ядрышках с использованием антител против универсального маркера репликации – PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) (рис. 23). С помощью этих антител мы показали, что PCNA распределен по всему ядрышку, независимо от стадии роста ооцита (рис. 23 а–с), подобно тому, как это было описано для ядрышек из опухолевых клеток человека (Chan et al., 1983). Результат говорит о том, что увеличение числа экстрахромосомных ядрышек в ЗП по мере роста ооцита обусловлено репликацией рДНК в экстрахромосомных ядрышках».

Результат интересный, но мне кажется, что детали этого эксперимента недостаточно обсуждены. Прежде всего, хотелось бы видеть указания на конкретные работы или обзоры, в которых было бы показано, что протеин PCNA встречается только в вилке репликации, что он не остается на дочерних нитях ДНК после репликации неограниченно долго. Наконец, что он обнаруживается только или преимущественно только в районе вилки репликации, а не формирует крупные агрегаты с иными протеинами. Например, относительно недавно С.Н. Нарышный в диссертации «Ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA): координатор клеточных функций в норме и патологии» М., 2011 развивал концепцию, что этот протеин имеет несколько форм, некоторые из которых вступают во взаимодействие со многими протеинами в ядре (белками ядерного матрикса, циклинами, с РНК-полимеразой III) и в цитоплазме, что в яичнике хомячка он детектируется на всех стадиях клеточного цикла и на стадии S его количество в клетке возрастает только в два раза, при этом заметное количество PCNA обнаружено в цитоплазме и количество этого «универсального маркера репликации» не меняется на разных стадиях клеточного цикла. Впрочем, и этот факт говорит в пользу рабочей гипотезы диссертанта, собственно в хроматине при переходе от стадии G₀ к S-фазе количество PCNA возросло в 12 раз. Таким образом, обсуждение деталей этого эксперимента, с моей точки зрения, было бы желательным.

Надо отметить высокое качество микрофотографий, иллюстрирующих разные этапы диссертационной работы.

Результаты работы неоднократно были представлены на отечественных и международных конференциях, опубликованы в 4-х высокорейтинговых журналах.

Выводы работы не вызывают у меня возражений, они обоснованы представленным в диссертации материалом и квалифицировано обсуждены.

Анализ текста диссертации показывает, что диссертация А.Г. Давидьян обладает внутренним единством, содержать новые научные результаты и обоснованные экспериментами положения, выдвигаемые для публичной защиты. Диссертация имеет все признаки научно-квалификационной работы международного научного уровня, в работе содержится решение научной проблемы, имеющей значение для развития биологии развития и эмбриологии, в ней квалифицировано изложены новые научно обоснованные гипотезы о внутриклеточных процессах, имеющих место в оогенезе рептилий и птиц.

Таким образом, диссертация Аси Генриковны ДАВИДЬЯН на тему: «ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА В РАСТУЩИХ ООЦИТАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ SAUROPSIDA», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология, с моей точки зрения соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Давидьян Ася Генриковна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.23. Биология развития, эмбриология . Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член диссертационного совета
Доктор биологических наук, профессор
кафедры цитологии и гистологии СПбГУ,
главный научный сотрудник с возложением обязанностей
заведующего лабораторией биосистематики и цитологии
Ботанического института им В.Л. Комарова РАН



А.В. Родионов

Дата 18.04.2022.

