

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Зацепиной Ольги Георгиевны на диссертационную работу Мелентьева Павла Алексеевича на тему «Функциональные аспекты роли гена *swiss cheese* в организме *Drosophila melanogaster*» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика

Исследование свойств генов модельных животных имеет важное значение для понимания функционирования этих генов у высших организмов. Использование дрозофилы в качестве модельного организма позволяет с помощью генетических методов вычлнить роль исследуемого гена в функционировании и физиологии определенных тканей и органов. Выбор гена *sws* для подробного изучения определён его эволюционной значимостью, а также разнообразными заболеваниями, связанными с мутациями его ортолога, гена *PNPLA6* человека. Охарактеризованные в литературе данные о вовлечённости *sws* и его ортологов в контроль жизнеспособности и работы клеток глии и нейронов свидетельствуют о неполноте картины в понимании биологии этих генов. Соответственно, диссертационное исследование П. А. Мелентьева, посвященное изучению роли гена *sws* в жизнедеятельности дрозофилы, чрезвычайно актуально и вносит вклад в развитие генетики и физиологии дрозофилы.

Следует отметить, что многоплановое диссертационное исследование П. А. Мелентьева посвящено анализу действия гена *sws* на совершенно разные аспекты жизнедеятельности плодовых мух *Drosophila melanogaster*, что потребовало от диссертанта освоения большого числа разнообразных методик. Это позволило диссертанту выявить профиль экспрессии гена *sws* в организме, обнаружить, что нормальная функция гена *sws* необходима для жизнеспособности особей на разных стадиях развития и влияет на плодовитость мух обоих полов. В работе были охарактеризованы изменения в окислительно-восстановительных и метаболических процессах в клетках нервной ткани, и выявлен потенциальный способ снижения интенсивности нейродегенеративного процесса. Полученные экспериментальные данные были опубликованы в трёх экспериментальных статьях в рецензируемых научных журналах, что подтверждает новизну результатов.

Текст диссертационной работы П. А. Мелентьева построен классическим образом и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список литературы (404

источника). Диссертация изложена на 170 страницах русского текста с 53 иллюстрациями (соответствует 164 страницам английского перевода), аккуратно оформлена. Во введении обоснована актуальность диссертационного исследования, приведены предпосылки и проанализирована степень разработанности темы исследования в виде обзора литературы, сформулированы цели и задачи исследования, отражены новизна, значимость, достоверность результатов работы, представлены положения, выносимые на защиту. Подробно изложены использованные материалы и методы, полученные результаты. Все результаты подробно обсуждаются и сравниваются диссертантом с данными научной литературы. Выводы, сделанные автором по результатам анализа проведённой работы, полностью обоснованы.

В разделе «Результаты» в полном объёме предоставлены экспериментальные данные, отвечающие на поставленные задачи. Заслуживают внимания интересные данные об экспрессии гена *sws* в соматических клетках репродуктивной системы самцов, а также низкой фертильности самцов, мутантных по гену *sws*. Показано, что в норме ген *sws* активно экспрессируется в растущих и зрелых клетках цист. У молодых 5 дневных мутантных *sws*¹ самцов наблюдается сниженная подвижность сперматозоидов, увеличивается содержание липидных капель в клетках цисты. На 15 день липидные капли скапливаются в проксимальном отделе семенника, а к 20 дню мутантные самцы становятся полностью стерильными. Таким образом в своей работе диссертант впервые показывает, что репродуктивная функция самцов дрозофилы зависит от гена, кодирующего лизофосфолипазу, подтверждая данные множества исследовательских групп о значимости метаболизма фосфолипидов для мужской фертильности у разных животных, в том числе млекопитающих и человека.

Было показано, что кроме нарушений самой репродуктивной системы, у самцов наблюдается снижение индекса ухаживания и локомоторной активности, что дополнительно снижает плодовитость самцов.

Снижение индекса ухаживания, локомоторной активности и сокращение продолжительности жизни обусловлены наблюдаемыми у мутантов процессами нейродегенерации мозга. В работе показано, что у мутантных пяти дневных самцов полости в мозге занимают 7% а у 25 дневных достигают 63%.

Результаты анализа плодовитости и жизнеспособности мутантов *sws*¹, свидетельствуют о том, что в ходе эволюции изменчивость гена *sws* подвергается давлению отбора.

По ходу исследования автор ставит перед собой задачу определить, какие клетки вносят наибольший вклад в наблюдаемые фенотипы. Для решения этой задачи с помощью специфической индукции системы РНК интерференции, направленной на деградацию мРНК гена *sws*, подавляли его экспрессию в разных типах клеток нервной системы.

Было продемонстрировано, что снижение уровня экспрессии мРНК *sws* в нейронах вызывает быстро прогрессирующую с возрастом нейродегенерацию мозга, сокращение продолжительности жизни более чем в 2 раза и снижение локомоторной активности.

Подавление экспрессии *sws* в нейронах приводит к окислительному стрессу. Так в цитоплазме нейронов мозга 5-дневных самцов наблюдается увеличение уровня окисленного глутатиона и количества перекиси водорода в митохондриях. Интересно, что с возрастом эти показатели сравниваются с показателями у контрольных самцов.

Снижение уровня мРНК *sws* в нейронах также вызывает увеличение числа липидных капель в участке центрального мозга в 4 раза по сравнению контролем у пятидневных самцов и в 6 раз у 25 дневных. Прогрессирующее с возрастом накопление липидных капель также было обнаружено в семенниках самцов с мутантным геном *sws*, что свидетельствует о важной роли гена *sws* в липидном обмене и в функционировании таких разных органов как семенники и мозг.

При подавлении экспрессии гена *sws* в глии, как и в нейронах, наблюдается увеличение уровня АФК в мозге мух, однако изменения в накоплении липидных капель в этом типе клеток не выявляются. Нейродегенерация в мозге становится заметной лишь у 30-45 дневных самцов. Продолжительность жизни снижается незначительно, снижается локомоторная активность. Соответственно, нормальный уровень экспрессии гена *sws* в нейронах и в значительно меньшей степени в глии жизненно важен для дрозофилы.

Полученные данные наглядно показывают, что фенотипы, наблюдаемые у мутантов *sws^l*, зависят от нарушения работы гена *sws* в разных клетках организма *Drosophila melanogaster*. Поэтому диссертационная работа П. А. Мелентьева расширяет представления о роли гена *sws* в организме плодовой мушки.

Ещё одним значимым результатом данного диссертационного исследования является описание последствий подавления экспрессии гена *sws* в глии и в нейронах на уровне исследования транскриптома и протеома. Выявлены конкретные мРНК и белки, экспрессия которых изменяется в ответ на нокдаун гена *sws*. Анализ транскриптома 25 дневных самцов с нокдауном гена *sws* в нейронах выявил увеличение уровня экспрессии 589 генов и снижение уровня экспрессии 940 генов. Нарушения в уровне экспрессии

такого числа гена свидетельствуют о серьезных нарушениях в функционировании организма в отсутствие экспрессии гена *sws* в нейронах. Для дальнейшего анализа были отобраны три гена *CG8628*, *CG4716*, *Dup99B*, уровень экспрессии которых при нокауте гена *sws* в нейронах увеличивается в 82, 120 и 220 раз, соответственно. Было предположено, что увеличение уровня мРНК этих генов может быть связано с наблюдаемыми патологическими изменениями в нервной ткани, вызванными нокаутом *sws*. Для проверки этой гипотезы методом РНК интерференции снижали уровень экспрессии этих генов. В результате было показано, что нейрон-специфичное подавление экспрессии генов *CG4716* и *CG8628* способствует снижению интенсивности нейродегенерации. Подавление же экспрессии гена *Dup99B* в мухах с нокаутом *sws* еще более сокращало продолжительность жизни. Так медиана продолжительности жизни особей с нокаутом гена *sws* - 30 дней, а у двойного нокаута 21 день. Этот факт свидетельствует о том, что увеличение уровня экспрессии гена *Dup99B* может иметь адаптивное значение и оказывать влияние на продолжительность жизни.

Анализ результатов, полученных в ходе выполнения диссертации и известных литературных данных, позволил Мелентьеву Павлу Алексеевичу предложить схему, обобщающую наблюдаемые физиологические изменения в клетках, вызванные подавленной функцией белка SWS/PNPLA6. В схеме автор рассматривает влияние активности лизофосфолипазы на различные клеточные процессы, затрагивающие функции эндоплазматического ретикулума, митохондрий, цитоскелета и везикулярного транспорта.

Последовательное логичное описание диссертантом предпосылок к проведению диссертационного исследования, обоснование актуальности, новизны, теоретической и практической значимости работы, ёмкая формулировка задач и методов, детальное описание результатов и подробное их обсуждение позволяет говорить о внимательном отношении диссертанта к деталям проведённой работы и о его вдумчивости в освещаемые им вопросы. Представленная в диссертации информация технического и методического характера, рисунки и подписи к ним, пояснения в тексте наглядно и достаточно полно описывают проделанную работу и полученные результаты, что не даёт поводов усомниться в достоверности данных, отражённых в диссертации. Кроме того, сформулированные в итоге выводы полностью обоснованы – они грамотно сформулированы на основании полученных результатов.

Таким образом, диссертация П. А. Мелентьева является качественным целостным научным исследованием, имеющим фундаментальное и практическое значение, и содержит новые актуальные данные о роли гена *sws* в организме *Drosophila melanogaster*.

Несмотря на общее положительное впечатление, которое вызывает диссертация, необходимо отметить ряд вопросов и замечаний:

1. Несмотря на тщательное оформление диссертации, в тексте имеются отдельные описки и сложные для восприятия фразы. Например, в материалах и методах, сказано, что идентифицировали белки при условии $FDR=0\%$.
2. Мертвые куколки (70%) с генотипом *sws*¹ свидетельствуют о важной роли гена *sws*¹ во время метаморфоза. К сожалению, анализ степени завершенности метаморфоза в погибших куколках не был проведен.
3. Из текста не ясно, встречаются ли полностью стерильные самцы *sws*¹, или у всех самцов снижена фертильность?
4. Как влияет нокдаун гена *sws*¹ на продолжительность жизни самок?
5. Из текста можно предположить, что к 20 дню самцы *sws*¹ становятся полностью стерильными. Для выяснения причин стерильности важно провести цитологический анализ семенников и выяснить, происходит ли прогрессирующая гибель сперматозоидов с возрастом самцов? Наблюдается ли апоптоз или некроз в тканях семенника? Происходит ли лизис тканей?
6. При старении у мутантов наблюдается увеличение числа липидных капель как в семенниках, так и в мозге, при этом уровень триглицеридов не изменяется. Что меняется в составе липидных капель?
7. Транскриптом получали из целых мух, а протеом из голов самцов. Соответственно, трудно сопоставлять результаты.
8. Может ли увеличение уровня экспрессии гена Dup99B играть адаптивное значение, так как его нокдаун снижает продолжительность жизни самцов с нокдауном *sws*?

Указанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы Мелентьева Павла Алексеевича. Постановка проблемы, формулирование конкретных задач, являются взвешенными и обоснованными. Работа хорошо спланирована, грамотно выполнена, а результаты подвергнуты адекватному анализу и обсуждению. Выводы из диссертационной работы соответствуют поставленным задачам.

Заключение

По теоретической и практической значимости результатов проведённого исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Мелентьева Павла Алексеевича на тему «Функциональные аспекты роли гена *swiss cheese* в организме *Drosophila melanogaster*» полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, согласно п. 9 «Положений о порядке присуждения учёных степеней», утверждённых постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а также соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете». Соискатель Мелентьев Павел Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Официальный оппонент: ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов биологической адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН», доктор биологических наук (03.01.03 Молекулярная биология),
Зацепина Ольга Георгиевна

119991, Москва, ул. Вавилова, д.32

Тел. (926)7251575

E-mail: olzacepina@yandex.ru

Зац

19.05.2022

Подпись О.Г. Зацепиной, заверяю

Учёный секретарь ИМБ РАН

кандидат ветеринарных наук



А
Бочаров Александр Анатольевич