

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации

Якимовой Анны Олеговны на тему: “Нарушения формирования нервных центров и поведения у мутантов по гену *sbr* (*Dm nxf1*) *Drosophila melanogaster*”, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Синтез мРНК, её процессинг, сплайсинг и последующий экспорт из ядра являются очень тесно связанными процессами. Соответственно, исследование того, как мРНК экспортируется из ядра и какие факторы вовлечены в этот процесс, существенно для понимания фундаментальных механизмов реализации генетической информации. Работа А. Якимовой посвящена исследованию гена *sbr* дрозофилы из семейства генов *Nxf* (nuclear export factor), представители которого имеются в геноме эукариот от дрожжей до человека и кодируют факторы, вовлеченные в транспорт большинства мРНК из ядра в цитоплазму. Белки семейства NXF являются высоко консервативными, обладают сходной доменной структурой и исследования на дрозофиле – классическом генетическом объекте – позволяют пролить свет на функционирование факторов ядерного экспорта мРНК у эукариот в целом. В то же время, мутации гена *sbr*, кодирующего фактор *nxf1* у дрозофилы характеризуются широким спектром плеiotропных эффектов, некоторые из них являются доминантными, среди которых наиболее часто встречаются нарушения фертильности самцов, дефекты нервной системы и нарушения поведения. Это заставляет предположить существование у гена *sbr* дополнительных тканеспецифичных функций, реализующихся через экспрессионный полиморфизм гена *sbr*. Диссертационная работа А.О. Якимовой направлена на исследование одной из наиболее сложных и интересных проблем, возникающих при рассмотрении подобных многофункциональных генов – специфической роли обладающего общеклеточными функциями гена (*sbr*) в формировании нервной системы и поведения. У человека нарушения функций генов семейства *Nxf* ассоциируют с серьезными дефектами развития мозга, умственной отсталостью и аутизмом. Формирование полноценно функционирующего мозга определяется согласованной реализацией генетических программ развития, определяющих формирование всего многообразия различных типов нейронов, и установлением корректных связей между ними. Именно для исследований таких сложных процессов, как формирование мозга, дрозофила, для которой очень хорошо разработаны генетические методы, биология развития, генетика поведения, является незаменимой моделью, а данные, полученные в таких исследованиях, могут быть экстраполированы на

более сложно устроенные организмы, включая человека. В связи с этим можно сделать вывод, что работа А.О. Якимовой безусловно очень актуальна и заслуживает серьезного внимания.

Диссертационная работа А.О. Якимовой изложена на 155 страницах и построена традиционно, состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы (Глава 1), главы материалы и методы (Глава 2), разделов результаты (Глава 3) и обсуждение результатов (Глава 4), заключения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы содержит 324 наименования работ отечественных и зарубежных авторов, из которых 16 — на русском языке.

В обзоре литературы автор последовательно рассматривает особенности строения и морфогенеза мозга и глаз у дрозофилы, ключевые процессы, происходящие при формировании мозга *D. melanogaster* и определяющие их факторы, а также последствия нарушения этих процессов и, наконец, семейство белков NXF. При чтении обзора литературы обращает на себя внимание очень высокая научная эрудиция автора, тщательность проработки материала и разносторонность представленной информации. Очень детально описана анатомия нервной системы дрозофилы на разных этапах развития, механика развития, генетический контроль детерминации возникновения различных типов нейронов и связей между ними. Специальный раздел посвящен белкам семейства NXF, их структуре и функциям, тщательно рассмотрены имеющиеся в мировой литературе сведения о гене *sbr* дрозофилы. Обзор литературы очень хорошо иллюстрирован и содержит 27 рисунков с детальными комментариями к каждому из них. В качестве недостатка стиля изложения именно этой части работы можно отметить только излишнее, на наш взгляд, употребление многочисленных сокращений (42 только для русских терминов), что временами затрудняет восприятие очень насыщенного информацией текста, особенно в тех случаях, когда несколько таких не всегда очевидных сокращений присутствуют в одном предложении. В целом, безусловно создается впечатление, что автор очень хорошо знаком с состоянием изучаемых проблем и легко ориентируется в наиболее перспективных направлениях их развития.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание генетических, цитологических и иммуноцитохимических методов, использованных автором работы. В работе использованы методы анализа поведения дрозофилы (тест на отрицательный геотаксис), методы приготовления препаратов органов на различных стадиях развития (мозг личинок первого возраста, глазо-антеннальные имагинальные диски и мозг личинок третьего возраста, мозг имаго); методы иммуногистохимической окраски; приготовления парафиновых срезов голов имаго; анализ препаратов при помощи световой и лазерной

сканирующей конфокальной микроскопии. Используемые автором методы вполне современные, надёжны и позволили получить оригинальные результаты. Все использованные методы являются абсолютно адекватными для решения поставленных автором диссертации задач, корректно выбраны и использованы методы статистической обработки полученных результатов.

В разделе «Результаты» А.О. Якимова рассматривает результаты собственных исследований роли гена *sbr* в развитии и функционировании мозга у *D. melanogaster* и характеристик локомоторной активности особей различных генотипов. Особенно благоприятное впечатление оставляет тщательный подход автора работы к выбору всех необходимых контролей в каждом проведенном эксперименте, позволяющих учитывать влияние изменения дозы гена *sbr* и хромосомной локализации аллеля дикого типа при исследовании эффектов мутации *sbr*¹² или делеции этого гена *sbr* (в гетерозиготе).

В работе описаны результаты последовательных исследований (начиная с изучения локомоторной активности особей), где результаты каждого из проведенных экспериментов корректно используются для выдвижения соответствующих экспериментально проверяемых предположений и служат логическим обоснованием для постановки дальнейших экспериментов. Такой подход крайне привлекателен и построение этого раздела работы выглядит логически очень стройным, но и необходимым образом включает детальное обсуждение результатов по ходу изложения (в том числе с привлечением данных литературы), так что, возможно, разделы «Результаты» и «Обсуждение результатов» стоило объединить.

Исследуя локомоторную активность, А.О. Якимова показала, что аллель *sbr*¹² проявляет доминант-негативные характеристики и приводит к нарушению активности особей, наиболее сильно выраженному у самцов. Поскольку в основе поведенческих дефектов могут лежать аномалии структуры нервных центров мозга, на следующем этапе автор исследовала структуры мозга самцов и самок тестируемых генотипов. Используя методы конфокальной микроскопии и анализа парафиновых срезов, А.О. Якимова выявила, что нарушение поведения и способности к отрицательному геотаксису у самцов, несущих аллель *sbr*¹² в гетерозиготе, ассоциировано с дефектами определенных функциональных центров мозга – эллипсоидного тела и медуллы, а также с увеличением уровня нейродегенерации. Логичным продолжением этих экспериментов было исследование тех процессов, которые могли привести к формированию подобных дефектов в ходе развития дрозофилы. Автором было показано, что дефекты формирования медуллы у самцов, несущих аллель *sbr*¹² в гетерозиготе, связаны с нарушением роста и терминации аксонов фоторецепторных нейронов и сопровождается повышенным уровнем нейродегенерации

уже на личиночной стадии развития. Наконец, поиск возможных механизмов, лежащих в основе выявленных дефектов, привел автора к исследованию локализации белка SBR в клетках мозга в динамике личиночного развития. В результате автором впервые установлено, что полноразмерный белок SBR имеет зоны преимущественной локализации в ткани мозга, маркируя определенные нейробласты и их потомков в личиночном периоде развития, а также присутствует в составе РНП-гранул в отростках нейронов. Анализ распределения белков SBR и dFMR1 (известного компонента РНП-гранул) в нейронах показал, что данные белки обнаруживаются в гранулах как вместе, так и отдельно, заставляя предположить, что у белка SBR есть специфические мРНК-мишени в цитоплазме. Результаты работы проиллюстрированы высококачественными микрофотографиями, убедительно доказывающими справедливость выносимых автором на защиту положений. Все полученные автором результаты являются новыми, воспроизводимыми и достоверными. В целом данный раздел диссертации показывает высокую профессиональную подготовку А.О. Якимовой, её умение проводить исследования, используя различные методы, дать содержательный и логичный анализ полученных данных, оценить их новизну и практическое значение.

Как уже отмечалось, значительная часть обсуждения именно собственных результатов автора сосредоточена в разделе «Результаты», так что по сути раздел «Обсуждения» выглядит как дополнение и продолжение этого раздела. Следует отметить, что, обсуждая различные предположения на основании собственных и представленных в литературе данных, автор очень корректно формулирует все выводы, строго ограничивая их именно доказанными в работе утверждениями. Единственный вопрос, который возникает по поводу обсуждения результатов, касается возможных функций укороченной нейроспецифичной формы белка SBR, возникающей в результате альтернативного сплайсинга. Поскольку данная форма белка никак не затронута использованными автором мутациями, рассуждения о его возможных функциях на основании представленных данных о доминант-негативном проявлении мутации *sbr*¹², затрагивающей полноразмерную форму белка, кажутся несколько спекулятивными или, по крайней мере, предварительными.

Прочтение диссертации принципиальных замечаний не вызывает. Диссертация написана хорошим русским языком и практически вообще не содержит частых в таких работах опечаток. Встречаются только единичные пропущенные буквы, слитые слова или опечатки (например: **хромосомой** локализации аллеля - стр 11, **картириджи** стр 28)

Отмеченные замечания не затрагивают существа работы и не изменяют высокой оценки ее научной значимости и убедительности и стройности изложения.

Рецензируемая работа представляет собой законченное исследование. Результаты исследования могут найти применение при чтении соответствующих спецкурсов.

В целом, задачи рецензируемой работы хорошо обоснованы, использованные методы отвечают поставленным задачам, а выводы согласуются с содержанием работы. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Диссертация Якимовой Анны Олеговны на тему: “Нарушения формирования нервных центров и поведения у мутантов по гену *sbr (Dm nxf1) Drosophila melanogaster*” представляет собой завершенное исследование в рамках поставленных задач. Полученные данные представляют интерес для специалистов генетиков, молекулярных биологов, нейробиологов и цитологов и могут быть использованы в соответствующих учреждениях РАН, кафедрах генетики, физиологии, молекулярной биологии и цитологии университетов, что позволяет сделать вывод о том, что диссертационная работа Якимовой А.О. соответствует требованиям, указанным в Положении о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 г. 2013 №842). Представленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей большое значение для развития генетики, а ее автор Якимова Анна Олеговна безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Старший научный сотрудник

Отделения молекулярной и радиационной биофизики

Петербургского института ядерной физики

НИЦ «Курчатовский институт»,

кандидат биологических наук

по специальности 03.02.07 – генетика

Конев Александр Юрьевич.

Петербургский институт ядерной физики НИЦ КИ

Ленинградская область г. Гатчина, Орлова роща

<http://www.pnpi.spb.ru/>

Тел. 813-71-462-64, konev.alexander@gmail.com

10.05.2015 г.

Подпись руки *Конев*

ЗАВЕРЯЮ:

Нач. отдела кадров

15. 05. 2018

ЗИНОВ

