

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки  
**Институт  
биологии развития**  
**им. Н.К. Кольцова РАН**

**(ИБР РАН)**  
ул. Вавилова, д. 26, Москва, 119334  
Тел. 8 (499)-135-33-22 Факс 8 (499)-135-80-12  
E-mail: idbras@bk.ru  
http://idbras.comcor.ru/  
ОКПО 02699062, ОГРН 1027700450800  
ИНН/КПП 7736044850/773601001

19.04.18 № 12506-05/219

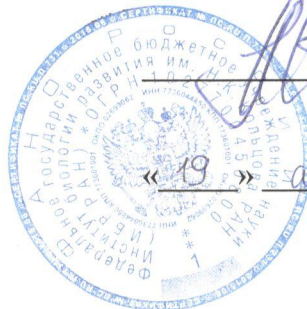
На № 01-115-4901 от 02.03.2018

**«У Т В Е Р Ж Д А Ю»**

**Директор**

**Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института биологии развития  
им. Н.К. Кольцова (ИБР РАН)  
Член-корр. РАН, д.б.н.**

  
\_\_\_\_\_ **А.В.Васильев**



\_\_\_\_\_ **2018 г.**

**Отзыв ведущей организации  
о научно-практической значимости диссертации  
Якимовой Анны Олеговны**

**на тему: "Нарушения формирования нервных центров и поведения у мутантов по гену *sbr (Dm nxf1) Drosophila melanogaster*", представленной к защите на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности:**

**03.02.07 – генетика.**

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Изучение экспрессии и функционирования эволюционно-консервативных генов является фундаментальной задачей современной генетики. В этом отношении особое место занимают гены, мутации которых проявляют плейотропный эффект. Исследование тонкой структуры конкретных аллелей и специфического фенотипа их носителей-мутантов важно для представления полной картины функционирования таких генов в разных органах и тканях. *Drosophila melanogaster* является классическим генетическим объектом для получения и изучения аллельных вариантов генов с плейотропным эффектом. В течение последних ста лет этот организм был незаменим в генетических экспериментах по исследованию механизмов наследственности и процессов развития. Достижения в области

визуализации и усовершенствования генетических методик привели к тому, что в последние годы дрозофила также стала одной из наиболее эффективных систем для изучения *in vivo* сложных функций регуляторных белков, контролирующих развитие мозга и поведенческие реакции. Ряд таких белков являются участниками эволюционно-консервативных сигнальных каскадов, необходимых для формирования точной позиционной информации в развивающемся мозге, где критическое значение имеют динамичные изменения цитоскелета и локализованная (отсроченная) трансляция мРНК. В этой связи актуальным является выявление и исследование конкретных аллелей генов, продукты которых являются РНК-связывающими белками, мутации которых проявляют нейроспецифический фенотип.

Работа Якимовой А.О. посвящена изучению нейроспецифической функции гена *D. melanogaster* - *sbr*, который кодирует РНК-связывающий белок эволюционно-консервативного семейства Nuclear Export Factor (NXF), участвующего в цитоплазматическом транспорте мРНК. Белки этого семейства могут взаимодействовать с белками, ассоциированными с цитоскелетом, определяя рост отростков нервных клеток и формирование корректных связей между нейронами. Изучение механизма функционирования конкретных генов семейства *Nxf* приблизит понимание того, как формируется позиционная информация в развивающемся мозге, определяемая отсроченной трансляцией целевых мРНК. Важность темы исследования продиктована также тем, что снижение экспрессии подобных факторов в мозге человека может приводить к нейродегенеративным заболеваниям. Актуальность темы исследования не вызывает сомнений.

## НОВИЗНА НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На наш взгляд основной научной новизной работы Якимовой А.О. является описание новой нейроспецифической функции гена *sbr* в мозге *D. melanogaster*, связанной с ростом и терминацией аксонов фоторецепторов, отличной от известной универсальной функции этого гена - контроль ядерно-цитоплазматического экспорта мРНК. Соискатель впервые показала, что нарушение нейроспецифической функции приводит к значимым нейродегенеративным процессам в мозге дрозофилы и вызывает аномальные поведенческие реакции. Несомненно, важным и интересным результатом Якимовой А.О. является установленный ею локальный характер распределения белка SBR, ограниченный определёнными нейробластами и их потомками к тому же в составе не всех, но ряда транспортных нейрональных РНП-гранул, говорящий о наличии целевых мРНК, транспорт которых осуществляется этим белком.

## **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Практическая значимость результатов работы Якимовой А.О. заключается в том, что она показала зависимость величины нейродегенеративных процессов в мозге дрозофил от уровня экспрессии гена *sbr*, усугубляющуюся с возрастом. Учитывая высокий консерватизм белков семейства NXF, результаты работы Якимовой А.О., полученные на дрозофиле, можно интерпретировать к подобным процессам у человека. Результаты диссертации можно использовать в качестве демонстрационного материала при чтении спецкурсов на медицинских и биологических факультетах высших образовательных заведений.

## **ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ**

Диссертация Якимовой А.О. состоит из стандартных разделов: «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов», «Результатов», «Обсуждения результатов», «Заключения», «Выводов» и «Списка литературы». Работа изложена на 155 страницах текста, иллюстрирована 59 рисунками и 4 таблицами. Список цитируемой литературы включает 324 источника.

Во Введении автор лаконично обосновывает актуальность и степень разработанности выбранной темы, формулирует цель и задачи исследования, выделяет научную новизну, практическую ценность, степень достоверности и апробацию результатов работы, даёт сведения о публикациях и выступлениях на научных форумах. Цель исследования и задачи сформулированы корректно.

Обзор литературы читается легко и с интересом, написан с использованием последних научных данных и свидетельствует о компетентности автора. Он снабжен 25 цветными рисунками - половина от всех рисунков (59) диссертационной работы, облегчающими восприятие материала. Обзор состоит из 4-х разделов. В первых 2-х разделах автор даёт подробнейшую характеристику структурно-функциональной организации мозга дрозофилы, рассматривает этапы формирования этого органа и генетический контроль его развития от эмбриона до имаго. Эти разделы дают ясное представление о дрозофиле, как модельном генетическом объекте, который можно с успехом использовать для изучения эволюционно консервативных процессов нейрогенеза, нарушение которых может приводить к нейродегенеративным заболеваниям. Два последних раздела посвящены характеристике эволюционно-консервативных белков семейства NXF (факторов ядерно-цитоплазматического транспорта) и их специфической

роли в нейрогенезе. Гомолог одного из этих белков (NXF1) у дрозофилы кодируется геном *sbr*, исследованию нейроспецифической функции которого и посвящена диссертационная работа. Автор приводит всю, известную на текущий момент, информацию, относительно этого гена и его мутантных производных, отмечая недостаточность исследования нейробиологических функций белка SBR, несмотря нейроспецифический фенотип и аномальное поведение особей ряда аллелей.

«Обзор литературы» производит целостное впечатление и полностью соответствует названию и тематике диссертации.

В главе «Материалы и методы» представлены подробные протоколы применяемых автором экспериментальных методик. Соискатель обосновывает выбор объекта исследований - носителей рецессивного летального аллеля *sbr*<sup>12</sup> и особей контрольных генотипов. Для получения дрозофил необходимого генотипа Якимов А.О. грамотно использовала классические генетические методы постановки скрещиваний. Изучение динамики активности мутантных и дикий дрозофил соискатель проводила в сравнительных поведенческих тестах на отрицательный геотаксис. Для препарирования, окраски и анализа структур мозга и имагинальных дисков Якимов А.О. использовала гистологические и иммуногистохимические методы. Анализ препаратов соискатель проводила при помощи световой и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Все эксперименты Якимов А.О. сопровождала строгими контролями и обязательными независимыми повторами. Объем выборок и их статистический анализ не даёт сомневаться в достоверности полученных результатов. Использованные методы характеризуют автора как экспериментатора высокой квалификации в области цито- и нейрогенетики.

Достоинством экспериментальной части представленной к защите работы является безупречная логика, последовательность и тщательность проведения экспериментов, критичность оценки полученных результатов. Экспериментальную работу Якимов А.О. начинает с изучения влияния аллеля *sbr*<sup>12</sup> на поведение самцов и самок *D. melanogaster*. Для этого соискатель сравнивает динамику активности особей в поведенческих тестах на отрицательный геотаксис. Сложность оценки влияния этого аллеля в поведенческих тестах заключается в том, что его носители являются рецессивными летальными и получить жизнеспособных особей можно только в сочетании с дикой копией гена. Соискатель сравнивает динамику активности особей семи генотипов и строит эксперименты так, чтобы учесть влияние дозы гена *sbr* дикого типа (в нормальном положении на X-хромосоме и при его транслокации на Y-хромосому), мутантного аллеля *sbr*<sup>12</sup> и делеции района *sbr*. Эти эксперименты, сопровождающиеся строгим статистическим анализом, позволили выявить

доминантно-негативный эффект аллеля *sbr*<sup>12</sup> у самцов и его влияние на возрастную динамику активности дрозофил обоих полов.

В поисках причин аномального поведения особей-носителей аллеля *sbr*<sup>12</sup> Якимова А.О. исследует морфологическую структуру мозга и уровень нейродегенерации. Эта серия экспериментов выполнена с помощью сравнительного анализа парафиновых срезов и конфокальных изображений мозга особей всех семи генотипов. В результате соискатель приходит к выводу, что присутствие аллеля *sbr*<sup>12</sup> в гетерозиготном состоянии приводит к возникновению структурных дефектов мозга у самцов и нейродегенеративных повреждений преимущественно в сетчатке, медулле зрительных долей и антеннальном механосенсорном моторном центре. В поисках механизма, лежащего в основе этих нарушений, Якимова А.О. тщательно анализирует мозг личинок разных генотипов и обнаруживает признаки нарушения упорядоченности фоторецепторных аксонов у самцов-носителей аллеля *sbr*<sup>12</sup>, а также признаки нейродегенерации в медулле. Соискатель делает обоснованный вывод о том, что дефекты структуры и очаги нейродегенерации в медулле могут быть следствием элиминации нейронов, сформировавших aberrантные синаптические связи.

Последняя серия экспериментов заключалась в определении характера локализации белка SBR в развивающемся мозге. В результате Якимова А.О. получила уникальные данные, демонстрирующие наличие SBR в составе специфических РНП-гранул, присутствующих, как в теле, так и в отростках нервных клеток. Более того, оказалось, что SBR выявляется также в составе нейрональных транспортных РНП-гранулах, содержащих РНК-связывающий белок dFMR1. Соискатель делает обоснованный вывод о том, что у белка SBR, как и у белка dFMR1, есть специфические мРНК-мишени в цитоплазме. Экспериментальный материал хорошо документирован и иллюстрирован.

В главе «Обсуждение» автор оценивает свои результаты, сравнивая их с известными работами в данной области, справедливо замечая необходимость дальнейшего исследования функций различных изоформ белка SBR в нервной системе и поиска их мРНК-мишеней.

Раздел «Заключение» предваряет «Выводы», помогая сконцентрировать внимание читающего на важности полученных результатов.

Тем не менее, диссертация Якимовой А.О. содержит ряд погрешностей, на которые хотелось бы обратить внимание автора.

1. В подписи к рис. 7 (стр. 23) имеется опечатка: сигнал "Dpp" назван "Dr".

2. Иногда неправильно употребляется падеж, например, "в формирующемся глазу" (стр. 24), нужно "в формирующемся глазе", а лучше: "в структурах глаза"; или на стр. 48: "на переднем краю" вместо "крае" (стр.) и т.д.

3. Отсчет событий принято вести от "момента формирования пупария", а не "после формирования куколки (п.ф.к.)" (стр. 26). Ведь формирование куколки - понятие растяжимое, это достаточно длительный процесс.

4. Не совсем удачно переводятся термины: вместо "ганглиолярная" материнская клетка (стр. 15), следовало переводить "ганглиозная", или "ганглионарная" материнская клетка.

5. В списке литературы нет ссылки *Tran et al., 2013*, на которую автор ссылается на стр. 47, либо эта ссылка содержит ошибку в фамилии автора.

6. Не очень хорошо звучит подпись к рисунку 17Б "Генетическая активация роста нейритов" (стр. 40), правильнее было бы "Генетический контроль активации нейритов".

Перечисленные замечания, однако, относятся исключительно к оформлению замечательного литературного обзора, носят рекомендательный характер и не снижают общей ценности самой работы.

По диссертационной работе к автору есть вопросы.

1. Как вы полагаете, можно ли объяснить снижение отрицательного геотаксиса у самок и самцов с делецией L4 наличием в этих линиях доминантного аллеля гена *miniature* ( $m^D$ )? И хотя этот ген кодирует белок внеклеточного матрикса эпидермальных тканей, известно, что его аллели могут влиять на поведение, связанное с циркадными ритмами. Также есть информация, что этот ген взаимодействует с геном, кодирующим фасцин *Singed*, который влияет на рост отростков первичных моторных нейронов брюшной нервной цепочки эмбрионов и вентрального торакального ганглия имаго. Планируется ли исследование этого отдела нервной системы у мутантных дрозофил?

2. В работе представлена локализация белка SBR в мозге дрозофил дикого типа. Проводилось ли исследование локализации белка SBR в мозге мутантов?

В целом, диссертационная работа Якимовой А.О. представляет собой законченный научно-исследовательский труд. Она выполнена на высоком методическом уровне. Полученные результаты суммированы в шести выводах, которые полностью соответствуют поставленной цели и задачам.

Содержание работы отражено в 12 публикациях, из них три статьи в ведущих рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ, и одна коллективная монография. Результаты исследований были представлены в устных и стендовых докладах на четырёх отечественных и четырёх зарубежных научных конференциях в период с 2012 по 2017 г.

Текст автореферата в достаточной мере отражает содержание диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы Якимовой А.О. могут быть использованы в ряде учреждений Российской академии наук генетического и медицинского профиля: Институте биологии гена РАН, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Институте молекулярной генетики РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН, на кафедрах биологического факультета Московского, Санкт-Петербургского, Новосибирского и Томского Государственных университетов и во многих других научных и прикладных учреждениях, изучающих причины нейродегенеративных процессов в мозге, а также механизмы транспорта мРНК и особенности функционирования РНК-связывающих белков.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Якимовой А.О. "Нарушения формирования нервных центров и поведения у мутантов по гену *sbr (Dm nxf1) Drosophila melanogaster*"», проведённая под руководством д.б.н. Мамон Людмилы Андреевны, является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне с использованием современных генетических и цитогенетических методов исследования. Результаты, приведённые в работе, представляют высокую значимость для понимания механизмов генетического контроля формирования нервных центров в норме и при патологиях, а также роли нейроспецифических РНК-связывающих транспортных белков в формировании структур мозга и поведенческих реакций организма. Диссертационная работа Якимовой А.О. по содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической ценности полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 03.02.07 – «Генетика», а ее автор Якимова Анна Олеговна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук.

Отзыв на диссертационную работу Якимовой А.О. заслушан, обсуждён, одобрен и утверждён на заседании объединенного семинара профильных лабораторий Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук – лаборатории эволюции генома и механизмов видообразования, лаборатории эволюционной генетики развития и эволюционной биологии развития, лаборатории молекулярно-генетических процессов развития. Присутствовало на заседании 35 человек. Результаты голосования: «за» - 35 чел., «против» - 0, «воздержались» - 0; протокол № 2 от 19 апреля 2018 г.

Заведующая лабораторией молекулярно-генетических процессов развития  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

доктор биологических наук,  
Симонова Ольга Борисовна



/Симонова О.Б./

Сведения о составителе отзыва:

Симонова Ольга Борисовна, доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – “генетика”, заведующая Лабораторией молекулярно-генетических процессов развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук.

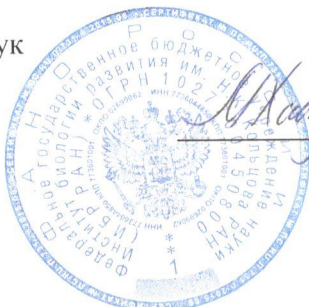
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 26

Телефон: 8(499)135-20-97

Электронная почта: osimonova@hotmail.com

«Подпись Симоновой О.Б. удостоверяю»

Ученый секретарь ИБР РАН,  
зав. аспирантурой,  
кандидат биологических наук  
Хабарова Марина Юрьевна



/Хабарова М.Ю./

Дата 19 апреля 2018 года