

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Кондукторовой Виктории
Владимировны
на тему: «Исследование временного и пространственного распределения
продуктов гена *germes* в овариальном фолликулогенезе *Xenopus laevis*»
по специальности 1.5.23 – Биология развития, эмбриология**

Несмотря на значительное число исследований, связанных с влиянием РНК и белков половой плазмы на формирование половых клеток, их миграцией и последующей внутриклеточной транслокацией материала половой плазмы до сих пор не существует целостной картины становления половой линии у *Xenopus* с участием материнских детерминант. Таким образом, **актуальность** диссертационного исследования В.В. Кондукторовой не вызывает сомнений.

Цель настоящей работы: исследовать временное и пространственное распределение продуктов гена *germes* в овариальном фолликулогенезе *Xenopus laevis*.

Работа В.В. Кондукторовой представляет собой рукопись общим объемом 152 страницы. Она иллюстрирована 2 таблицами и 24 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методологии и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка публикаций автора по теме работы, списка использованной литературы из 315 источников (из них 312 на иностранных языках).

Содержание данного исследования связано с изучением продуктов гена *germes* в оогенезе и раннем развитии шпорцевой лягушки, а также их распространенности среди других амфибий.

По теме диссертации В.В. Кондукторовой **опубликовано** 4 статьи в рецензируемом международном журнале, который входит в международные реферативные базы данных и системы цитирования. В работах отражены все основные положения и выводы диссертации. Результаты исследований

неоднократно обсуждались на международных, всероссийских, региональных симпозиумах, конференциях и совещаниях.

Объектом исследования служили шпорцевые лягушки *X. laevis* (Daudin), содержащиеся на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова. В экспериментах использовали ооциты, а также зародыши на последовательных стадиях раннего развития. Для филогенетического исследования распространенности гена среди других групп амфибий были использованы малая шпорцевая лягушка *Silurana (Xenopus) tropicalis*, жаба *Bufo bufo*, травяная лягушка *Rana temporaria*, жерлянка *Bombina bombina*, а также малая когтистая лягушка *Hymenochirus boettgeri*. Ооциты разных стадий были выделены вручную диссекцией из яичников самок *X. laevis*, *X. tropicalis*, *H. boettgeri*, *R. temporaria*, *B. bufo*, *B. bombina*. Эмбрионы *X. laevis* получали путем оплодотворения зрелых ооцитов *in vitro*.

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием протоколов, опубликованных в зарубежных рецензируемых журналах. Все данные получены в экспериментах, методики которых соответствуют современным правилам проведения исследований. Все эксперименты были проведены в нескольких повторностях.

В.В. Кондукторова самостоятельно ставила задачи, освоила использованные в работе методики, планировала и выполняла все эксперименты в рамках данной работы. Автором выполнена вся математическая обработка первичного материала, сформулированы все выводы и положения работы.

Научная новизна работы состоит в том, что В.В. Кондукторовой впервые проведен ряд новых исследований гена *germes*. Получены данные о синтезе и паттернах локализации белка. Выявлены различия в содержании мРНК и белка, в ходе развития зародышей *X. laevis*.

Также в данном исследовании проведен анализ распространенности гена *germes* среди других бесхвостых амфибий.

Автором установлено, что РНК и белок *Germes* синтезируются не только в ооцитах, но и также в окружающих фолликулярных клетках. Сведения о том, что РНК и белок половой линии обнаружены в соматических клетках, являются уникальными и не описаны более ни для одного гена-маркера половой плазмы.

Новые данные, полученные В.В. Кондукторовой, дополняют сведения о гене половой плазмы и первичных половых клетках, что важно для построения целостной картины формирования половой линии при детерминационном пути.

В первой части введения автором аргументировано обосновывается актуальность и проблематика диссертационного исследования. Во второй части введения грамотно сформулированы цели и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту.

Раздел 3 представляет собой обзор отечественной и зарубежной научной литературы, в котором автор приводит современные представления о структуре фолликула и формировании фолликулярной оболочки у модельного вида – *X. laevis*, составе и формировании половой плазмы. Описаны особенности образования первичных половых клеток у *Xenopus*, гены-маркеры половой плазмы и первичных половых клеток. Также рассмотрены вопросы локализации детерминантов в оогенезе, как ключ полярности паттерна и будущего развития. Щелевые контакты ооцита и фолликулярных клеток как основа межклеточной коммуникации. Кроме того, приведены литературные сведения о вкладе фолликулярных клеток в процесс вителлогенеза и данные о роли фолликулярных клеток в стероидогенезе.

Раздел 4 содержит сведения о методологии и методах исследования.

В основе проведенной работы лежит комплекс современных методов биологии развития, молекулярной биологии, цитологии. Содержание и

локализация белка исследованы с помощью Вестерн-блоттинга и иммуноцитохимии. Сыворотку, содержащую поликлональные антитела против *Germes*, получили после 5 этапов инъекций белых новозеландских кроликов согласно стандартному протоколу хроматографически очищенным рекомбинантным белком. Предгибридизацию проводили при +60°C в течение 4-6 часов в буфере для гибридизации, а после в течение ночи гибридизацию с 0.5 мкг синтезированного *in vitro* антисмыслового РНК-зонда. Фолликулы после *in situ* гибридизации с зондом против *germes*, заключали в эпоновую смесь. Ультратонкие срезы анализировали при помощи трансмиссионного микроскопа JEM-1011 и фотографировали на цифровую фотокамеру Gatan ES500W Model 782. Анализ окрашенных образцов проводили с помощью конфокального микроскопа Leica SP5 или Olympus FluoView FV10i. ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Рекомбинантные ДНК-конструкты выполнены с помощью методов молекулярного клонирования. Анализ распространенности гена среди бесхвостых амфибий был проведен с помощью биоинформатических методов и метода молекулярного клонирования.

Раздел 5 посвящён изложению полученных диссертантом результатов исследования. Изучение В.В. Кондукторовой содержания РНК и белка *germes* в оогенезе и раннем развитии шпорцевой лягушки показало, что белок, как и РНК, присутствует в весомом количестве, как весь период оогенеза, так и в эмбриональном периоде, вплоть до стадии нейрулы, после чего его содержание постепенно снижается, достигая минимума к 48-ой стадии. Причем, присутствие белка *Germes* в развитии наблюдается гораздо дольше, чем мРНК. Белок меняет свое распределение и в развитии, локализуясь в ППК, и сохраняется значительно дольше.

На основе структурного анализа последовательности РНК и белка *germes* автором выявлены повторы из тринадцати САС мотивов отдельно и в различных сочетаниях с другими нуклеотидами. В 3'НТО *germes* обнаружены

мотивы, вероятно, необходимые для локализации, как в митохондриальном облаке (ранний путь), так и для направленного транспорта на вегетативный полюс ооцита (поздний). На основании результатов *in situ* гибридизации, основным является механизм раннего пути. Белок *Germes* состоит из 587 аминокислот, имеет молекулярный вес 68 кДа и по предсказанным данным имеет α -спирали 51.1%, прямые участки 7.8% и петли 41.1%. В своем составе белок имеет две лейциновые молнии, что по мнению автора, играет роль в белок-белковых взаимодействиях или имеет значение при передаче внутриклеточного сигнала.

Исследование В.В. Кондукторовой продуктов гена *germes* выявило, что белок также локализуется в фолликулярных клетках, как больших, так и малых фолликулов, причем не только в цитоплазме, но и ядре. Белок *Germes*, выявленный полученными автором антителами, визуализируется в фолликулярных клетках (ФК) в виде линейных структур длиной около 5,5 мкм в контактных зонах соседних ФК. Такие, не описанные ранее структуры, выявлялись в ФК как больших, так и малых ооцитов.

Автором с помощью метода ПЦР-РВ было подтверждено наличие мРНК *germes* в фолликулярных клетках. Показано, что удельное количество транскрипта в ФК малых стадий ооцитов превышало количество в самих ооцитах примерно в 4 раза. А содержание мРНК в ФК больших фолликулов было сопоставимо с уровнем в ооцитах V–VI стадий, при этом, количество РНК как в ооците, так и в ФК с ростом ооцита падает.

Белок *Germes*, выявленный антителами в зоне макровиллей, а также в приграничных зонах самих ФК, по мнению диссертанта, может служить еще одним аргументом в пользу транспортной функции этого белка. Более того, по предсказанным данным, последовательность белка *Germes* может подвергаться модификации посредством миристоилирования. В этом случае белок способен взаимодействовать с плазматической мембраной, что, возможно, мы и наблюдаем по картине локализации белка в ФК. Для ФК

транспортные функции являются одной из важнейших, и транспортная функция белка может быть первоочередной.

На основании превышения количества удельной мРНК в фолликулярных оболочках, а также наличия РНК в ядре В.В. Кондукторова пришла к заключению, что клетки сами способны к экспрессии *germes*. Автором было отмечено наличие несплайсированной мРНК в ФК больших и малых фолликулов, доказывающее экспрессию *germes* в них на протяжении всего оогенеза. Поскольку у амфибий фолликулярные клетки сообщаются с ооцитом посредством щелевых контактов, через которые не могут проходить большие молекулы, то экспрессия *germes* в половых и соматических клетках фолликула, вероятно, независима, на основании чего, В.В. Кондукторовой сделано предположение, что белок выполняет, скорее всего, разные функции в клетках половой и соматической линии.

Биоинформатический анализ проведенный автором, показал, что, гомологи последовательности *germes* не обнаружены в геномах видов, относящихся к другим семействам бесхвостых амфибий, что подтверждено исследованием экспрессии ортологов *germes* в тканях яичников представителей бесхвостых амфибий, включенных в исследование.

Присутствие короткого консервативного участка *germes* (150 п. н.) было проанализировано В.В. Кондукторовой в транскриптах яичников у шести видов Anura: *X. laevis*, *X. tropicalis*, *Hymenochirus boettgeri*, *Rana temporaria*, *Bufo bufo* и *Bombina bombina*. Автором были амплифицированы, клонированы и секвенированы короткие последовательности не только *X. laevis*, *X. tropicalis*, *H. boettgeri*. ПЦР-анализ экспрессии гомологов *germes* *R. temporaria*, *B. bufo* и *B. bombina* не выявил гомологичных последовательностей, что совпадает с результатами биоинформатического анализа. В.В. Кондукторовой установлено, что *germes* встречается только в семействе Pipidae. Гомолог гена и транскрипт *germes* были обнаружены только у видов, принадлежащих к родам *Xenopus* и *Hymenochirus*, т.е. ген *germes* возник в пределах семейства Pipidae, а позднее был утрачен в одной

из линий, к которой относится род *Pseudhymenochirus*. Сравнительный анализ консенсусной последовательности лейциновой молнии, проведенный В.В. Кондукторовой, у исследованных видов – носителей *germes* показал ее относительную неизменность, что, по-видимому, обусловлено ее ролью в функциях белка у тех видов, где он отмечен.

Таким образом, диссертантом получены **новые уникальные данные** по временному наличию и локализации мРНК и белка *Germes* в онтогенезе *X. laevis*. Впервые описано, что ген половой плазмы и первичных половых клеток экспрессируется также и в соматических клетках, окружающих ооцит. Белок в фолликулярных клетках имеет свою отличительную локализацию, он обнаруживается в виде линейных структур вдоль мембран внутри клеток - в местах их контактов друг с другом. Примечательно, что оба продукта гена меняют свой паттерн распределения с распространенного по всему объему до локализованного в островках половой плазмы. Вероятно, наличие лейциновых молний в последовательности белка говорит о наличии белковых партнеров, способствующих транслокации белка. Отдельный интерес представляет проведенный автором анализ на наличие исследуемого гена среди ряда представителей бесхвостых амфибий, что позволило сделать заключение о степени его уникальности и положении на филогенетическом дереве Anura.

При ознакомлении с диссертацией возникли **замечания и вопросы**. Так, к сожалению, в диссертации нарушена нумерация рисунков (см. стр 103-109). Для выполнения основной части исследования были использованы *X. laevis*, содержащиеся на кафедре эмбриологии. В то время, как для филогенетического исследования распространенности гена *germes* у других бесхвостых амфибий использованы животные, приобретенные в зоомагазине. Является ли допустимым использование для исследования материала из такого источника, как во втором случае?

Впрочем, эти замечания не снижают ценности и значения выполненного диссертационного исследования.

Теоретическое значение работы состоит в том, что на примере изучения продуктов гена половой плазмы *germes* изучены паттерны распределения и содержания мРНК и белок *Germes* в ооцитах и соматических фолликулярных клетках яичника *X. laevis*. Также проведен широкий анализ распространенности этого гена у других амфибий.

Полученные В.В. Кондукторовой новые сведения расширяют понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе фолликулогенеза, а также о влиянии одного и того же гена на ооциты и соматические клетки яичника, поскольку исследуемый ген является одним из многих генов-маркеров половой плазмы и половых клеток.

Практическая значимость исследования В.В. Кондукторовой состоит в том, что результаты, диссертации могут быть использованы в учебном процессе для обновления методических материалов и развития учебных практических курсов по биологии развития. Как исследователи, так и студенты, работающие в данной области знания, применяя результаты исследования будут получать более полное и точное представление об в оогенезе, раннем развитии амфибий и связанных с этим периодом процессов, что будет положительно влиять на качество образования.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.23 – Биология развития, эмбриология (по биологическим наукам), а также

критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кондукторова В.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.23 – Биология развития, эмбриология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией функциональной экологии наземных животных,
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии
наук

Вершинин Владимир Леонидович



01.03.2024 г.

*Подпись Вершинина В.Л.
завершено
ученик секретарь
Королевская И.В.
01.03.2024г.*

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.5.15 – Экология (биологические науки)

1.5.12 – Зоология (биологические науки)

Адрес места работы:

620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, д. 202,

Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской
академии наук, лаборатория функциональной экологии наземных животных,