

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию

Галактионова Николая Кирилловича

«Транспозон *hemar1*: организация в геноме и роль в формировании генетического разнообразия партенит и церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae)»,

представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Более тридцати лет назад известный популяризатор науки советский биолог Борис Михайлович Медников, размышляя над направлениями развития молекулярной биологии, сказал, что «...только поняв принципы функционирования геномов, мы сможем объяснить удивительные различия в их структуре, мы поймем структуру из функции, а не функцию из структуры». Этот вопрос установления причинно-следственной связи между структурой и функцией геномов не теряет своей актуальности и в 21-ом веке. Тотальное секвенирование геномов, благодаря реализации проекта «Геном человека» по определению нуклеотидной последовательности ДНК человека, создает фундаментальную основу сравнительной геномики. Исследование структурной организации генома стало одной из центральных задач современной молекулярной биологии. Основной массив ядерной ДНК эукариот представлен (до 95%) диспергированными или тандемными повторенными последовательностями. ДНК - транспозоны, которые известны как мобильные элементы, длительное время оставались вне поля зрения функциональной геномики. Однако уже накопилось достаточно информации, указывающей на то, что эти элементы могут служить факторами, приводящими к возникновению геномного разнообразия, не сцепленного с половым процессом. Таким образом – возникает необходимость исследовать структуру и организацию в геноме таких элементов и механизмы их влияния на биологические функции содержащих их организмов.

Решению этой важной проблемы и посвящена диссертационная работа Галактионова Н.К., основной **целью** которой является определение

последовательности транспозона *mariner* в геноме *Himasthla elongata* (Trematoda; Echinostomatidae) и определение его роли в формировании генетической вариабельности партеногенетического потомства (редий и церкарий).

В работе определены четыре основных *задачи*:

1. Выявить и охарактеризовать транспозон *mariner* в геноме *H. elongata*;
2. Установить наличие или отсутствие генетической природы вариабельности клонов партенит и церкарий *H. elongata* методом AFLP;
3. Проверить возможность использования элемента *mariner* как маркера генетической изменчивости (в случае ее обнаружения) клонов редий и церкарий исследуемого вида трематод;
4. Оценить роль транспозона *mariner* в формировании нестабильности генома клонов редий и церкарий *H. elongata*.

Положения, выносимые на защиту, четко сформулированы и в полном объеме представляют решаемую автором проблему.

Диссертация Галактионова Н.К. написана по традиционному плану и содержит все необходимые разделы – введение, обзор литературы, экспериментальная часть, включающая методы и результаты исследования, обсуждение, выводы и список литературы, содержащий 162 публикации. Работа изложена на 104 страницах и иллюстрирована 22 рисунками, 5 таблицами и содержит 3 приложения.

Во Введении обосновывается актуальность выбранной для исследования проблемы, формулируются цель и задачи исследования и положения, выносимые на защиту, определена научная новизна полученных результатов, их теоретическое и практическое значение, а также отмечено, что все результаты, включенные в работу, получены лично автором.

Обзор литературы написан ясно и логично, хорошим языком. В нем проводится тщательный и всесторонний анализ состояния исследований в изучаемой научной области. Дана молекулярная и генетическая характеристика мобильных элементов генома эукариот: ретроэлементов и ДНК-транспозонов. Отдельный раздел содержит исчерпывающую информацию о структуре,

представленности и разнообразии элементов *mariner* в геномах эукариот. Рассмотрена гипотеза об участии элементов *mariner* в горизонтальном переносе генетической информации у эукариот. Автор отмечает, что, несмотря на большой объем накопленных в литературе данных, до сих пор не ясны такие особенности организации и функционирования в геноме элементов *mariner*, как участие в генерации генетической variability организмов, а также в осуществлении горизонтального переноса генетической информации у эукариот. В связи с этим, поскольку важнейшим условием изучения элементов *mariner* является подбор адекватных и “говорящих” модельных систем, автор переходит к описанию модельного объекта, представленного паразитом и его хозяином. Таким объектом стал паразитический плоский червь *Himasthla elongata*, имеющий широкий круг хозяев и стадию бесполого или партеногенетического размножения. Описан его жизненный цикл, а также важная особенность структуры ДНК трематод: генетическая variability партенит. Поэтому обзор литературы логично завершается описанием основных методов определения генетического полиморфизма. Таким образом, акцентировано внимание на тех нерешенных проблемах и вопросах, которые требуют своего решения и составили суть предпринятого автором исследования.

Диссертационная работа Галактионова Н.К. выполнена на высоком методическом уровне с применением методов молекулярной, клеточной и компьютерной биологии, что обеспечило получение важных и достоверных результатов. Среди них: выделение геномной ДНК, выделение РНК, ПЦР и ОТ-ПЦР, клонирование и секвенирование ДНК, получение меченых ДНК-зондов, гибридизация по Саузерну и дот-блот гибридизация, получение препаратов ядер и определение размера генома *H. elongata*, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), гель электрофорез и методы определения полиморфизмов в ДНК (AFLP и TID). Особо следует отметить широкий спектр методов компьютерной биологии с использованием самых современных многообразных программ анализа структуры генома, а также применение адекватных методов статистической обработки результатов AFLP-анализа.

Глава с описанием результатов собственных исследований, объединенных в трех логически завершенных разделах, заслуживает самой высокой оценки с точки зрения их разнообразия и достоверности. Все представленные в работе данные являются новыми.

В геноме плоского червя *Himasthla elongata* были выявлены последовательности ДНК-транспозона, относящиеся к семейству транспозонов *mariner*, получившие название *hemar1*. Определена полная нуклеотидная последовательность выявленного элемента *hemar1*, а также двух его копий *hemar2* и *hemar3*. Проведен ее сравнительный компьютерный анализ. С целью изучения организации транспозона *hemar1* в геноме *H. elongata* определен размер генома этого представителя трематод, что сделало возможным установить в нем копийность исследуемого элемента. На основании данных гибридизации по Саузерну и FISH на интерфазных ядрах, доказан дисперсный характер распределения элемента *hemar* и выявлена кластеризация некоторых его копий в геноме. Также установлено, что геномы всех вовлеченных в жизненный цикл *H. elongata* хозяев несут копии *mariner*, однако последовательности сильно дивергированы с таковой *hemar1*. На этом основании сделан вывод, что, скорее всего, последовательность *hemar1* в кругу хозяев *H. elongata* горизонтально не перемещалась.

С помощью метода AFLP (amplified fragment length polymorphism) установлено, что геномы партенит и церкарий *H. elongata* вариабельны.

Подтверждено, что геномы особей церкарий внутри одного клона обладают меньшим уровнем вариабельности, чем особи церкарий – представителей разных клонов. Таким образом, установлено наличие генетической основы клональной вариабельности партенит и церкарий *H. elongata*.

Применение метода TID (transposon insertion display) с использованием последовательности *hemar1*, позволило выявить клональный полиморфизм у партенит и церкарий *H. elongata*. По сравнению с AFLP, этот подход позволил существенно повысить количество выявляемых полиморфных фрагментов как при сравнении геномов особей внутри клона, так и между клонами. Следовательно, копии *hemar1* вовлечены в формирование генетической

вариабельности партенит и церкарий *H. elongata*. Другими словами - эти последовательности служат фактором нестабильности генома и участвуют как в клональной изменчивости, так и в эволюции генома *H. elongata*.

Все полученные в работе результаты подробно обсуждаются в обширном разделе «Обсуждение». В этом разделе автор приводит филограмму родства элементов *mariner*, в основе которой лежит выравнивание аминокислотных последовательностей известных MLE и исследуемого *hemar1* и резюмирует, что последний принадлежит к подсемейству *capitata*. Отмечается также, что изучение *hemar1* позволило впервые установить последовательности ITR элемента, принадлежащего к подсемейству *capitata*. Особо обсуждается вопрос вклада *hemar1* в формирование генетической вариабельности партенит, который еще требует детализации и дополнительных исследований с целью применения в практике. Автор определяет вектор развития своей дальнейшей работы: клонирование и секвенирование активной копии *mariner*.

Выводы представлены корректно и полностью отражают полученные автором экспериментальные результаты и сделанные на их основе теоретические заключения.

Материалы диссертации представлены в 13 печатных работах, в их числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций. Промежуточные этапы исследования, основные положения и результаты работы широко обсуждались автором на различных отечественных и иностранных конференциях и симпозиумах.

Автореферат диссертационной работы Галактионова Н.К. в полной мере отражает основные результаты и выдвигаемые на их основе положения и соответствует требованиям ВАК РФ.

В целом диссертационная работа Галактионова Николая Кирилловича, несомненно, заслуживает положительной оценки. Основная цель исследования достигнута. Поставленные задачи решены, получены новые данные, выводы сформулированы четко и в соответствии с положениями, вынесенными на защиту. Принципиальных замечаний и возражений работа не вызывает. Имеется вопрос дискуссионного характера и ряд замечаний по рукописи диссертации, в

основном редакционного характера, которые не влияют на общую положительную оценку работы.

Вопрос.

Можно ли использовать полученные в работе данные для объяснения рекомбинации в соматических клетках?

Замечания.

1. Обозначение элемента *mariner* у *Himasthla elongata* в рукописи встречается в трех вариантах: *hemar1*, *hemar1* и *hemarI*, например на стр. 72 на разных строчках текста – разные обозначения.
2. Два совершенно разных по смыслу и области применения термина: *легирование* и *лигирование* применяются для обозначения встраивания вставки ДНК в вектор, например на стр. 42 и 44.
3. На Таблицу 2 (стр. 28) в тексте ссылки нет, хотя о содержащейся в ней информации в тексте говорится.
4. При характеристике автономных транспозонов на стр. 20 дана ссылка на рисунок 4, хотя информация о них дана на рисунке 3.
5. Рукопись диссертации следовало тщательнее “вычитать”, поскольку встречаются простые опечатки (пропуски букв, повтор слов и др.), несогласования в падежах и др.

Заключение

Диссертационная работа Галактионова Николая Кирилловича «Транспозон *hemar1*: организация в геноме и роль в формировании генетического разнообразия партенит и церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae)» представляет собой самостоятельный научно-исследовательский труд, посвященный изучению мало разработанной на сегодняшний день проблеме – выявлению новых семейств мобильных элементов (МЭ) ДНК в геномах беспозвоночных и оценке их вклада в формирование митотической нестабильности генома. Автор впервые выявил, клонировал и охарактеризовал (распределение в геноме, определение сходных последовательностей в геномах хозяев, компьютерное сравнение со сходными

последовательностями из баз данных) полноразмерный транспозон *mariner* трематоды *H. elongata*. Впервые определены концевые последовательности представителя подсемейства *capitata* семейства транспозонов *mariner* и двумя методами (AFLP и TID) установлена клональная генетическая изменчивость партенит *H. elongata*. Дальнейшее определение полиморфных последовательностей ДНК, служащих маркерами, и роли МЭ в формировании клональной изменчивости при партеногенезе может стать основой для разработки новых методов лечения паразитарных заболеваний.

Все вышесказанное позволяет заключить, что по своей актуальности, новизне поставленных и решенных задач, научному и практическому значению диссертационная работа Галактионова Николая Кирилловича «Транспозон *hemar1*: организация в геноме и роль в формировании генетического разнообразия партенит и церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae)» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам соискатель заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Ведущий научный сотрудник
Отдела молекулярной генетики
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Институт экспериментальной медицины»
доктор биологических наук, профессор

 Н.В. Цымбаленко

Адрес: 197376, Санкт-Петербург
ул. Ак. Павлова, д. 12,
ФГБНУ «ИЭМ»
Тел. +7(812) 234-33-56
e-mail: tsymbalenkonv@mail.ru

«04» июня 2015 г.

Подпись 
Удостоверяется
Нач.отд.кадров ФГБНУ «ИЭМ» 

