

ЗАЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **НИКОЛАЯ КИРИЛЛОВИЧА ГАЛАКТИОНОВА**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение Диссертационного совета от 16 октября 2015 года № 200/379

О присуждении **НИКОЛАЮ КИРИЛЛОВИЧУ ГАЛАКТИОНОВУ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «**ТРАНСПОЗОН *HEMAR1*: ОРГАНИЗАЦИЯ В ГЕНОМЕ И РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПАРТЕНИТ И ЦЕРКАРИЙ ТРЕМАТОДЫ *HIMASTHLA ELONGATA* (TREMATODA, ECHINOSTOMATIDAE)**»

По специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Принята к защите 10.04.2015 г., протокол № 197/376б Диссертационным советом Д002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий пр., д. 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия, утвержден приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г. Частичные изменения Совета утверждены Приказом № 731/нк от 05.11.2013 г.

Соискатель Николай Кириллович Галактионов, 1984 г.р., в 2008 г. окончил биолого-почвенный факультет Санкт-Петербургского государственного университета по специальности «биология» по профилю «клеточная биология» с присвоением степени магистра. Работа выполнялась в порядке прохождения очной аспирантуры в период с **30.09.2008 по 29.09.2011** в Лаборатории морфологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук под руководством д.б.н., проф. Подгорной Ольги Игоревны. Диссертационная тема и план утверждены Ученым советом ФГБУН Институт цитологии РАН 148/859(2) от 14.05.2009. В ФГБУН Институт цитологии РАН **работает** с 2009 г. по настоящее время, последняя должность старший лаборант-исследователь с в/о в Лаборатории морфологии клетки Института цитологии РАН.

Диссертация выполнена в Группе некодирующей ДНК Лаборатории морфологии клетки ФГБУН Институт цитологии РАН.

Научный руководитель:

Подгорная Ольга Игоревна, доктор биологических наук, профессор, заведующая Группой некодирующей ДНК Лаборатории морфологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. **Надежда Васильевна Цымбаленко**, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярной генетики человека Отдела молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт экспериментальной медицины», профессор Кафедры зоологии Факультета биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена».
2. **Дмитрий Александрович Крамеров**, доктор биологических наук, профессор, заведующий Лабораторией эволюции геномов эукариот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН.

Дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация:

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск) в своем положительном отзыве (заключение подготовлено руководителем Отдела разнообразия и эволюции геномов ФГБУН ИМКБ СО РАН, заведующим Лабораторией цитогенетики животных, доктором биологических наук, профессором Александром Сергеевичем Графодатским и утверждено директором ИМКБ СО РАН, академиком Игорем Федоровичем Жимулевым) указала, что диссертационная работа является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, полностью отвечающим требованием, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.) по

специальности 03.01.03 – молекулярная биология, а ее автор заслуживает искомой ученой степени кандидата биологических наук.

Дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 12 опубликованных работ по теме диссертации, 4 статьи (4 печатных листа) в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций и 8 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. **Galaktionov N.K.**, Solovyeva A.I., Fedorov A.V., Podgornaya O.I. Trematode *Himasthla elongata* mariner element (*Hemar*): structure and applications. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2014, 322: 142–155. Статья посвящена изучению структуры и организации в геноме транспозона *hemar* и его вклада в формирование клональной изменчивости партенит и церкарий *Himasthla elongata*. Установлено, что в геноме *H. elongata* присутствует транспозон *hemar* входящий в семейство транспозонов *mariner*. Копии *Hemar* дисперсно распределены в геноме *H. elongata* и насчитывают ~ 100 копий. В ходе работы впервые продемонстрирована генетическая изменчивость партенит и церкарий *H. elongata* и установлено, что последовательность транспозона *hemar* принимает участие в ее формировании. doi: 10.1002/jez.b.22553
2. А.И. Соловьева, **Н.К. Галактионов**, О.И. Подгорная. 2013. Ретротранспозон класса LINE является компонентом паттерна полиморфных фрагментов партенит трематоды *Himasthla elongata*. Цитология. 55(7): 492—500. Статья посвящена изучению клональной изменчивости партенит и церкарий *H. elongata*. Проанализирован состав последовательностей полиморфных и консервативных зон деления продуктов реакции TID. Установлено, что консервативные зоны содержат последовательности ретроэлементов без LTR в то время как полиморфные зоны обогащены последовательностями ретротранспозонов семейства LINE, несущие LTR. DOI: 10.1134/S1990519X13060126
3. **Н.К. Галактионов**, О.И. Подгорная, А.В. Федоров, 2009. Характеристика транспозона *mariner* из генома плоского паразитического червя *Himasthla elongata*. Цитология: 51 (11):

924—928. Статья посвящена выявлению транспозона семейства *mariner* в геноме *H. elongata*. используя вырожденные праймеры в геноме *H. elongata* выявлен консервативный участок последовательности транспозона *mariner*. Его анализ в базах данных первичных последовательностей позволил отнести его к подсемейству *capitata* семейства транспозонов *Tc1/mariner*. DOI: 10.1134/S1990519X09060042

4. О. И. Подгорная, **Н. К. Галактионов**, 2009. Мобильные элементы как потенциальные векторы горизонтального переноса генетической информации в системах паразит-хозяин. Труды зоологического института РАН: 313 (3): 283—296. В статье дискутируется вопрос о том, могут ли мобильные элементы (МЭ) ДНК выступать как векторы горизонтального переноса (ГП) генетической информации. Отмечено, что МЭ могут существенно модифицировать геномный ландшафт, выступать триггерами эпигенетической модификации генома. На примерах показано, что с наибольшей вероятностью ГП проходит между геномами паразита и хозяина. Сделан вывод, что не смотря на теоретическую возможность ГП транспозонов, на сегодняшний день доказательств этого процесса нет. УДК 577.216
5. Соловьева А.И., Подгорная О.И, **Галактионов Н.К.** 2011. Метод Транспозон Дисплея как инструмент выявления генетического полиморфизма. Морской биологический симпозиум СПб. Сборник тезисов докладов, стр. 81. Показана возможность использования метода транспозон дисплея (TID), основанного на последовательности *hemar* для выявления генетического полиморфизма партенит и церкарий *H. elongata*. <http://www.hydrobiology.spb.ru/lib/mbs/2011/mbs2011.htm>
6. **N. K. Galaktionov**, A. V. Fedorov, O. I. Podgornaya. 2010. HemarI a novel transposable element of mariner family from the genome of *Himasthla elongata* fluke. Conference of American Society for Microbiology (Mobile DNA). Montreal, Canada. April 24—28, Abstract book, p. 148. Работа посвящена выявлению транспозона семейства *mariner* в геноме *H. elongata*. Выявлена плноразмерная последовательность транспозона *hemar1*. Ее анализ в базах данных первичных последовательностей позволил отнести его к подсемейству *capitata* семейства транспозонов *Tc1/mariner*. Впервые выявлены концевые повторы (ITR) для представителя подсемейства *capitata* транспозонов *mariner*. <http://conferences.asm.org/images/2010.4.24.pdf>

7. Подгорная О.И., Галактионов Н.К. 2008. О возможности переноса генетической информации в системе паразит-хозяин. В кн.: Материалы IV Всероссийского Съезда Паразитологического общества при РАН «Паразитология в XXI веке — проблемы, методы, решения». Т. 3. СПб., изд-во «ЛЕМА», 36—41. Проанализировано, присутствуют ли копии *hemar1* в геномах окончательного и промежуточного хозяев *H. elongata*. Установлено, что сходных с *hemar1* в геномах хозяев нет. Сделан вывод о том, что в изученной модели горизонтального переноса последовательности *hemar1* не происходило. http://www.zin.ru/conferences/2008_Cong4_PO_RAN/2008_IV_PO_RAN_tom3.pdf
8. Н.К. Галактионов, А.В. Федоров, О.И. Подгорная, 2008. Транспозон *mariner* из генома паразитического плоского червя *Himasthla elongata*. Современные методы микроскопии в исследовании живых систем. СПб, Россия. 17—21 ноября, стр. 4. В работе проведена FISH с *hemar1*-Cy5 зондом на интерфазных ядрах *H. elongata*. установлено, что копии *hemar1* распределены в геноме дисперсно, а некоторые копии кластеризуются.
9. Galaktionov N.K., Galaktionov K.V., Skirnisson K. 2009. An attempt to analysis of life cycles of renicolid trematodes (Digenea, Renicolidae) using ITS1 region of the rDNA sequences. The 3rd Symposium of the Scandianavian-Baltic Society for Parasitology. Riga, Latvia, 16—18 April. Abstract book, p.16. В работе проведен филогенетический анализ последовательностей ITS1 rDNA из геномов различных представителей рениколид (Digenea, Renicolidae). Показано, что рениколиды распадаются на несколько групп и их систематика нуждается в пересмотре. http://biology.lv/conferences/3sbsp/Symposium_programme.pdf
10. Galaktionov N.K., Fedorov A.V., Podgornaya O.I. 2008. Identification and characterization of a novel *HemarI* and *HemarII* elements belonging to *mariner* family of transposons, in the genome of flatworm *Himasthla elongata* (Platyhelminthes; Tremetoda; Echinodermata). Xth European Multicolloquium of Parasitology. 2008. Paris, France. August 24—29, Abstract book, p. 148. В работе выявлены две последовательности транспозона *hemar* – *hemar1* и *hemar2*. Установлено, что они представляют собой копии элемента *hemar* и дисперсно распределены в геноме *Himasthla elongata*. <http://gplf.assoc.univ-bpclermont.fr//EMOP10.pdf>
11. Галактионов Н.К., Федоров А.В., Подгорная О.И. 2007. Клонирование и анализ транспозона *mariner* из генома паразитического плоского червя *Himasthla elongata*. СПб, Россия. Цитология, 49 (9) p. 735. В работе представлены результаты выявления

транспозона *mariner* в генома паразитического плоского червя *Himasthla elongata*. Показано, что выявляемая последовательность представляет собой консервативную область, характерную для транспозонов *mariner*.
http://www.tsitologiya.cytspb.rssi.ru/49_9/abstracts_09_07.pdf

12. **Галактионов Н.К.**, Зайцева М.А., Сухачев А.Н., Дьячков И.С., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В., Харазова А.Д., Галактионов К.В., Подгорная О.И. 2006. Роль поверхностных антигенов церкарий трематод *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae) в иммунном ответе мидий (*Mytilus edulis*). Фауна, биология, морфология и систематика паразитов. Материалы международной научной конференции. Москва, с.78—79. В работе получены TritonX100-растворимая фракция поверхностных гликопротеидов *Himasthla elongata*. Показано, что добавление такой фракции к гемолимфе *Himasthla elongata* приводит к дифференцировке гемоцитов *Mytilus edulis*.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора биологических наук, профессора, директора ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, **Глупова Виктора Вячеславовича**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Лаборатории паразитологии ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, **Юрловой Наталии Ильиничны**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Кандидата биологических наук, научного сотрудника Беломорской Биологической Станции «Картеш» ФГБУН «Зоологический Институт» РАН **Николаева Кирилла Евгеньевича**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Доктора медицинских наук, профессора Кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Кировской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, **Зайцева Валерия Борисовича**. Отзыв положительный, без замечаний.

5. Доктора биологических наук, профессора, заведующего Кафедрой зоологии и экологии животных Факультета естественных наук ФГБОУ ВПО «Псковского государственного университета», **Прокофьева Владимира Викторовича**. Отзыв положительный, без замечаний.
6. Доктора биологических наук, профессора, заведующего Кафедрой зоологии Факультета биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена», **Атаева Геннадия Леонидовича**. Отзыв положительный, содержит замечания:
- «Возникшие при чтении автореферата вопросы и замечания касаются в основном формулировок автора и его подчас вольных использований ряда терминов. Очевидно, что глубокая вовлеченность в суть работы способствовала переносу «производственной лексики» на страницы текста. Приведу несколько замечаний.
- Так, излишне образно утверждается, что «ретроэлементы размножаются в геноме с помощью механизма обратной транскрипции». Размножаются организмы. А транспозоны – увеличивают число копий (с.3).
- Не уверен, что правомочно применение термина «клональная изменчивость». Особи не идентичные генетически – по определению не являются клонами. Почему во введении написано, что, так как у партенит партеногенез, то все потомки одного миазиды должны быть генетически идентичны? Разумеется, новых генов при партеногенезе не вносится. Но комбинации аллелей могут быть разные, как и при любом другом типе полового размножения, так как ему предшествует гомологичная рекомбинация.
- Отмеченные неточности, вероятно, обусловлены необходимостью переосмысления нашего отношения к явлению партеногенеза вообще и апомиксиса в частности. Они ни в коей мере не снижают общей высокой оценки диссертации Николая Кирилловича, которая, отвечает требованиям предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология».
7. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Лаборатории организации генома ФГБУН Институт биологии гена РАН, **Семеновая Серафимы Константиновны**. Отзыв положительный, без замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук **С.О. Скарлато**, зам. дир. и зав. лаб. ФГБУН ИНЦ РАН, куратор Совета;
2. Доктор физико-математических наук **А.Л. Тимковский**, член Совета

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области молекулярной биологии, в частности исследований мобильных элементов ДНК и паразитических организмов, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны научные идеи, согласно которым ДНК транспозоны участвуют в формировании генетического разнообразия клонов партенит и церкарий *H. elongata* при бесполом размножении и не перемещаются горизонтально внутри изученной системы паразит-хозяин;

предложен оригинальный научный подход к изучению генетической variability клонов и участию ДНК транспозонов в формировании клональной изменчивости при помощи последовательного применения методов AFLP (Полиморфизм длин амплифицированных фрагментов) и TDI (Транспозон-дисплей). AFLP позволил установить факт генетической variability клонов, а TID – участие транспозона *hemar1* в формировании такой variability;

доказаны полиморфизм распределения копий транспозона *hemar1* в геномах клонов партенит и церкарий *H. elongata* и отсутствие недавнего горизонтального перемещения копий *hemar1* среди хозяев *H. elongata*;

введены новые представления, согласно которым именно транспозоны служат основой для формирования генетического разнообразия при партеногенетическом размножении.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие существующие представления о роли диспергированных повторов в формировании нестабильности генома и горизонтальном переносе копий транспозонов между паразитом и хозяином;

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных методов цитологии и молекулярной биологии, в том числе конфокальную микроскопию, рестрикцию и различные варианты ПЦР, включая AFLP и TID, гибридизацию, молекулярное клонирование, секвенирование, различные типы

электрофорезов, включая секвенирующий, выделение ДНК из малых количеств материала, *in vitro* культивирование партенит *H. elongata*;

изложены новые экспериментальные факты о молекулярной организации транспозонов семейства *mariner*;

раскрыты особенности организации транспозона *hemarI*. Представлена новая последовательность транспозона семейства *mariner*, в составе которой выявлена открытая рамка считывания, кодирующая все необходимое для перемещения элемента и фланкированная инвертированными повторами. *HemarI* дисперсно распределен в геноме, его прочитанные копии содержат сдвиги рамок считывания, однако элемент выявлен в транскриптом *H. elongata*;

изучены особенности распределения элемента *hemar1* в геномах клонов партенит и церкарий *H. elongata* и возможность горизонтального перемещения последовательности *hemar1* в кругу хозяев *H. elongata*;

проведена оценка возможности изучения полиморфизма распределения низкокопийного элемента методом TID в геномах партеногенетических клонов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработана и внедрена в практику методика исследования клональной вариабельности методом TID;

определены перспективы применения теоретических результатов исследования в практике изучения генетического разнообразия клонов животных;

представлены новые данные о молекулярной организации последовательностей транспозонов семейства *mariner*.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании (сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5, секвенатор капиллярный ABI Prism 3500xl, термоциклер BioRad C1000 и CFX-96); выбор примененных методов и использованного оборудования обоснован поставленными в работе задачами;

теория о том, что ДНК транспозоны служат источником клональной изменчивости партенит, опирается на данные о повышенном содержании ДНК транспозонов в геномах животных, размножающихся без полового процесса, а также на данные о рекомбинации отдельных копий транспозонов и их перемещении в геноме; данные, полученные из

других источников, согласуются с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе современных литературных данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее другими научными коллективами, связанных с тематикой диссертации

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным; **использованы** современные экспериментальные подходы (ПЦР, ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ, AFLP, TID, флуоресцентная микроскопия, капиллярное секвенирование ДНК, электрофорез, в том числе в секвенирующем ПААГ, введение меченых нуклеотидов и гибридизация, методы генной инженерии, методы биоинформатики с использованием современных программных пакетов (Unipro UGENE, BioEdit, GeleQuest, ClusterVis, MEGA 4-6, wuBLAST), пакетов, доступных on line (ClustalW2, MUSCLE, COBALT, Motif Scan, Motif Finder и Helix-Turn-Helix Motif Prediction) и баз данных (NCBI, EBI)).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии соискателя в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации полученных экспериментальных данных с применением современных цитологических и молекулярно-биологических методов исследования. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований, подготовки и написании статей и тезисов по теме диссертации, представлял материалы диссертации на отечественных и зарубежных конференциях.

Диссертация Николая Кирилловича Галактионова посвящена изучению транспозона *hemaI* в геноме паразитического плоского червя *H. elongata*, с использованием цитологических и молекулярно-биологических методов и является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.) по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

На заседании 16 октября 2015 г. Диссертационный совет принял решение присудить Николаю Кирилловичу Галактионову ученую степень кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология (03.01.03)

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 9 по специальности рассматриваемой диссертации, из 24 человек входящих в состав Диссертационного совета, – проголосовали:

«ЗА» - 20, «ПРОТИВ» - нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель заседания: председатель
Диссертационного совета Д 002.230.01
доктор биологических наук, профессор



А.Л.Юдин

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.230.01
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

«19» октября 2015 г.