

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
**ИНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ
БИОЛОГИИ**
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИМКБ СО РАН)

пр. Академика Лаврентьева, д. 8/2, Новосибирск, 630090
телефон (383) 3639042, факс (383) 3639078
e-mail: info@mcb.nsc.ru
<http://www.mcb.nsc.ru>

ОКПО 30781167, ОГРН 1115476157070,
ИНН / КПП 5408291757 / 540801001

21.08.2015 № 15318-01-2171

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института молекулярной и
клеточной биологии СО РАН, академик,
Жимулев И.Ф.

27 августа 2015 г.



ОТЗЫВ
ведущего учреждения

о диссертации Галактионова Николая Кирилловича «Транспозон *hemarI*: организация в геноме и роль в формировании генетического разнообразия партенит и церкарий трематод *Himasthla elongata* (Trematoda, Echinostomatidae)» представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Диссертация посвящена изучению мало разработанной на сегодняшний день проблеме – выявлению новых семейств мобильных элементов (МЭ) в геномах беспозвоночных и оценке их вклада в формирование митотической нестабильности генома. В пост-геномную эру стали известны последовательности большинства генов многих организмов. После чтения Геномов биологическое сообщество занимается в основном систематизацией огромного массива знаний (data mining). Однако, МЭ, которые составляют основную часть геномов высших эукариот (~50%) остаются недостаточно изученными и нет даже их общепринятой классификации. Наличие геномов делает возможным сравнение вновь выявленных МЭ. Именно такой задаче посвящена настоящая работа, поэтому ее **актуальность** в рамках задач биологического сообщества в пост-геномную эру не вызывает сомнений.

Работа разделена на две части. В первой автор впервые выявляет в геноме трематоды *Himasthla elongata* транспозон *hemar1*, относящийся к семейству транспозонов *mariner*. В работе приведена исчерпывающая молекулярная характеристика *hemar1*, включающая определение полной нуклеотидной последовательности элемента, ее компьютерный анализ, определение нуклеотидных последовательностей двух его копий. Изучена организация транспозона *hemar1* в геноме. Для этого определен размер генома *H. elongata*, что сделало возможным установить копияность элемента в геноме. Данные гибридизации по Саузерну и FISH на интерфазных ядрах позволили доказать дисперсный характер распределения элемента и обнаружить кластеризацию некоторых его копий в геноме. Установлено, что геномы всех вовлеченных в жизненный цикл *H. elongata* хозяев несут копии

mariner. Однако последовательности сильно дивергированы по сравнению с таковой *hemar1*. На этом основании сделан вывод, что, скорее всего, последовательность *hemar1* горизонтально не перемещалась в кругу хозяев *H. elongata*.

Вторая часть работы посвящена доказательству генетической основы вариабельности партенит и церкарий *H. elongata*. С помощью методики AFLP (amplified fragment length polymorphism) установлено, что геномы партенит и церкарий *H. elongata* вариабельны. Подтверждено, что геномы особей церкарий внутри одного клона (партеногенетическое потомство одной личинки-мирацидия, паразитирующее внутри одного моллюска) обладают меньшим уровнем вариабельности, чем особи церкарий – представителей разных клонов. Таким образом, установлено наличие генетической основы клональной вариабельности партенит и церкарий *H. elongata*. Далее автор проверяет участие копий *hemar1* в формировании генетической изменчивости клонов партенит и церкарий *H. elongata* с использованием метода TID (transposon insertion display). Этот подход позволяет оценить генетическую вариабельность близкородственных организмов на основании полиморфизма распределения какого-либо МЭ в геноме. Так TID, основанный на последовательности *hemarI*, выявил клональный полиморфизм у партенит и церкарий *H. elongata*. По сравнению с AFLP, TID, основанный на последовательности *hemarI*, позволил существенно повысить количество полиморфных фрагментов как при сравнении геномов особей внутри клона, так и между клонами. Это служит указанием на то, что копии *hemarI* вовлечены в формирование генетической вариабельности партенит и церкарий *H. elongata*, служат фактором нестабильности генома и участвуют как в клональной изменчивости, так и в эволюции генома *H. elongata*.

Этими результатами определяется важное **теоретическое** значение работы.

Объектом работы является паразитический организм, относящийся к группе трематод, патогенных и для человека. Закономерности, выявленные на морском организме *H. elongata* могут быть экстраполированы на патогенных для человека трематод и способствовать разработке новых лекарственных препаратов. Результаты 2й части работы, посвященной клональной изменчивости, получены непростыми, основанными на ПЦР, методами. Подобные методы могут быть использованы для определения любого типа генетической неоднородности, например, для отслеживания процесса малигнизации.

Отлаживание таких методик составляет **практическое** значение работы.

Диссертационная работа Н.К.Галактионова написана по традиционному плану и содержит все общепринятые разделы. Раздел «Материалы и методы» большой (стр 40-49), отражает методическое богатство работы и высокую квалификацию автора. Текст вычитан довольно хорошо, но некоторые опечатки встречаются и будут указаны ниже. В автореферате указаны формальные характеристики – структура и объем работы, что позволяет рецензенту не заниматься подсчетом количества ссылок и рисунков.

Литературный обзор читается с интересом и свидетельствует о том, что автор знает свою область исследований от старых до современных работ. Литературный обзор хорошо подготавливает читателя к дальнейшему восприятию материала. Заметно местами, что текст явно переводной. Это черта большинства современных работ с молекулярно биологическими методами.

Методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам, они разнообразны и включают молекулярный, цитологический подходы и биоинформатику. В диссертации методы изложены в необходимом и достаточном объеме. Автореферат, который в целом хорошо отражает содержание работы, не перегружен методическими подробностями, чем часто грешат диссертанты. Среди методов указаны компьютерные методы анализа последовательностей, которые диссертанты часто теряют.

Результаты описаны достаточно полно и подробно. Генно-инженерная часть работы подкреплена Дополнительными материалами. Однако, видно, что на вычитывание дополнительных материалов сил уже не хватило (см ниже).

Замеченные огрехи не носят принципиального характера и могли бы быть исправлены в ходе редактирования.

Обсуждение работы написано очень хорошо. Автор получил результаты, противоречащие распространенной гипотезе о горизонтальном переносе на основе *mariner*. Обсудить и опубликовать результаты, опровергающие господствующую теорию, гораздо труднее, чем результаты «в струе». Тем не менее, это автору вполне удалось.

Выводы работы хорошо сформулированы и подтверждены адекватно иллюстрированным экспериментальным материалом. Погрешностей в цитировании очень мало (на стр. 14 встречается ссылка с инициалами), список литературы выполнен вполне грамотно.

В целом работа производит хорошее впечатление, однако тем более досадны недостатки редактирования работы.

Удивительным образом, в списке сокращений одно из важнейших для работы сокращений – TE, означает не перемещающиеся элементы (*transposable elements*), а буфер трис-ЭДТА. При этом TE как перемещающиеся элементы встречается в тексте многократно, в то время как TE как буфер – только в Методах.

Следует говорить *hemar1* специфичный праймер (стр.11)

На стр.16 предложение: Все диспергированные повторы объединяют в интроны II-го типа. Рецензенту неизвестна такая классификация.

На стр.48 приведена ссылка на таблицу без номера таблицы. Рецензент догадался, что это табл.3.

Рисунок 7 (стр.51) очевидно вставлен на последних этапах написания работы, потому что ссылки на него в тексте неадекватны. В тексте (рис.7, Б,...) – на самом рисунке обозначений А и Б нет. На той же 51 стр этот же рисунок фигурирует как рис.8.

На стр.58 автор утверждает, что «Компьютерный анализ последовательности *hemar1* показал два сайта для рестриктазы *MspI* (Рис. 7)» Рецензенту удалось найти на рис.7 только сайты для *HinfI*, а сайты для *MspI* есть на рис.9.

На стр.64 есть редкой кривизны выражение «заставляют предположить генетическую основу изменчивости особей».

В подписи под рис.20 (стр.71) фигурирует *hem1* специфичный праймер *HeC1_F*, Таблица 3, который не удалось обнаружить в Таблице 3.

На стр.77 появляется аббревиатура ГП, которой нет в списке сокращений. Не вдруг догадаешься, что так обозначен горизонтальный перенос, также одно из ключевых понятий работы. То же относится и к сокращению МЭ, которое, наверное, означает «мобильные элементы» (стр. 83)

После списка литературы следует пустой раздел под заглавием «Благодарности». Не думаю, что автор не благодарен своим учителям и коллегам. Полагаю, это следствие недостаточно тщательного редактирования. Надеюсь, он восполнит это упущение на докладе.

В разделе «Дополнительные материалы» подписи под таблицами вполне загадочны. Приложение 1 – подпись отсылает к табл. NN, в то время как это табл.3; вся таблица является расширенной версией рис. 14, а не рис.7, как утверждает подпись. Приложение 2 – в подписи отсутствует принципиально важное предложение: MLE расположены в порядке убывания сходства. Без этого трудно понять логику таблицы.

Рецензент не может не отметить некоторые содержательные **недостатки работы**.

1. Саузерн-гибридизация и гибридизация *in situ* (FISH) свидетельствуют, что *mariner* в геноме *H.elongata* может быть расположен кластерами. Почему не сделали FISH на метафазных хромосомах, чтобы окончательно в этом убедиться?
2. Несколько раз в работе встречается утверждение о том, что количество ДНК транспозонов составляет 3-15%. Цитирование приведено, однако в большин-

стве хорошо собранных геномов млекопитающих ДНК транспозоны составляют ~1%. Следовало бы об этом упомянуть.

3. На стр.16 сказано, что ретроэлементы разделяют на ретротранспозоны и ретропозоны. Рецензент согласен с тем, что классификация всех ТЕ (или МЭ) совершенно неудовлетворительна и неоднозначна. Однако, сейчас эти термины употребляют скорее как синонимы. Поэтому автор и сам путается (стр.17)

Замеченные недостатки носят скорее дискуссионный характер.

Полученные автором конструкции **могут быть использованы** при дальнейшей работе с трематодами; для разработки антипаразитарных пепаратов, подавляющих изменчивость. Результаты диссертации Н.К.Галактионова можно рекомендовать к использованию в исследованиях, посвященных изучению любого типа генетической изменчивости, а также при чтении курсов лекций по биологии в Московском, Новосибирском, Санкт-Петербургском и других университетах.

В целом работа производит благоприятное впечатление цельностью и разнообразием подходов к решению четко сформулированных задач. По актуальности выбранной темы и новизне полученных результатов, их значению для дальнейших исследований, диссертационная работа Н.К.Галактионова удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании Объединенного семинара Отдела разнообразия и эволюции геномов Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН , протокол № 19 21.08.2015.

Отзыв составлен Зав. Отдела разнообразия и эволюции геномов Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Д.б.н., проф., А. С. Графодатским

21.08.2015 г.

