

## ОТЗЫВ официального ОППОНЕНТА

на работу Анны Ивановны Соловьевой «МОБИЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ УЧАСТВУЮТ В ОБРАЗОВАНИИ КЛОНАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ *HIMASTHLA ELONGATA* (TREMATODA, HIMASTHLIDAE)», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Представленная к защите диссертация Анны Ивановны Соловьевой изложена на 116 страницах формата А4, включает 65 рисунков и 5 таблиц. Диссертация построена по традиционному плану, включает «Введение», главы «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список используемой литературы» два Приложения и раздел «Благодарности».

Во Введении диссертант констатирует, что тема диссертации – изучение биологической роли мобильных генетических элементов генома (транспозонов), имеет как фундаментальное общенаучное, так и прикладное значение. По мнению диссертанта, с которым трудно не согласиться, научная значимость этого направления исследований обусловлена тем, что транспозоны, составляющие от 3 до 80 % генома у разных видов эукариот, по современным данным, являются важным фактором изменчивости генома. В ряде случаев они выступают как индукторы эктопической рекомбинации, в других случаях как факторы мутагенеза, модификаторы транскрипции и сплайсинга. Есть все основания думать, что с транспозонами связаны несколько механизмов адаптивных и не адаптивных модификаций генома, и что транспозоны играют важную роль в процессах видообразования.

Далее диссертант обращает внимание читателя на то, что на нескольких экспериментальных моделях неоднократно показано – множественные транспозиции, как правило, сопровождают мейоз, происходят после того, как самых ранних этапах эмбриогенеза после объединяются женская и мужская половые клетки. В соматических клетках, напротив, транспозоны, как правило, транскрипционно инертны и потому иммобилизованы. Осознание этого факта дало возможность руководителю диссертации и диссертанту предложить новую

оригинальную модель для исследования индуцируемой транспозонами изменчивости генома – представителей класса Trematoda.

Трематоды обладают сложным жизненным циклом, в котором гермафродитные и партеногенетические поколения сменяют друг друга. До недавнего времени считалось, что особи партеногенетических поколений, редии или спороцисты и производимые ими церкарии, должны быть генетически идентичны, так как они, по сути, представляют собой клоны, являющиеся продуктами диплоидного (апомиктического) партеногенеза. Однако, есть основания считать, что геномы у редий и церкарий одного клона не идентичны (Grevelding, 1999; Galaktionov et al., 2016). Представляет большой общебиологический интерес, на представителях еще одного, ранее не исследованного семейства трематод, во-первых, подтвердить существование геномного полиморфизма у редий и церкарий одного происхождения (одного клона), и, во-вторых, исследовать возможную роль в этом нетривиальном явлении транспозонов разных классов, как ДНК-, так и ретротранспозонов.

Новый, неисследованный ранее объект, представитель относительно малоисследованной группы паразитических плоских червей, интересная, имеющая общебиологическое значение проблема – актуальность предпринятого диссертантом исследования не вызывает никакого сомнения.

Диссертант так формулирует конкретные цели и задачи предпринятого исследования (стр. 6):

Цель — выявить изменчивость в геноме партенит *Himasthla elongata* методом SSAP и охарактеризовать изменяющиеся последовательности.

Задачи:

1. Провести генотипирование партенит (спороцист и редий) *Himasthla elongata* методом S-SAP и охарактеризовать последовательности из полиморфных и консервативных зон (диссертант имеет ввиду участков электрофореграммы, в которых располагаются изменчивые и неизменчивые фрагменты генома).
2. Определить распределение клонированных фрагментов в паттернах генотипирования методом дот-блота.

3. Определить, присутствуют ли последовательности, комплементарные исследуемым типам транспозонов в транскриптоме *H. elongata*.

4. Изучить распределение найденных клонированных фрагментов в геноме *H. elongata* методом FISH.

Все поставленные диссертантом задачи современные, решение их требует владения комплексом современных высокоэффективных методов анализа генома и кариотипа, все они касаются не исследованных характеристик генома паразитического червя *Himasthla elongata* и имеют непосредственное отношение к заявленной цели проекта: могут быть непосредственно связаны с внутриклональной изменчивостью геномов партенит, индуцируемой посредством транспозонов.

Принимая во внимание значимость процессов изменчивости геномов паразитических трематод, научная новизна и научно-практическое значение представляемой к защите диссертационной работы А.И. Соловьевой не вызывают никаких сомнений.

Очень хорошее впечатление производит глава «Обзор литературы». Обзор написан свежо, интересен и оригинален по затронутым темам. В нем последовательно разбираются две темы – сначала дается общее описание биологии транспозонов эукариот, их возможная роль изменчивости генома и затем дано достаточно подробное описание жизненного цикла объекта исследований – представителя трематод сем. Himasthlidae вида *Himasthla elongata*.

Обзор литературы хорошо читается, он основан на самых современных публикациях, хорошо иллюстрирован рисунками и таблицами. Уровень теоретической подготовки А.И. Соловьевой, ее подготовленность к решению поставленных перед ней научно-исследовательских задач, не вызывает никаких сомнений. Единственный недостаток, на который надо обратить внимание диссертанта, это то, что по всему обзору приходится сталкиваться с неудачным, по мнению оппонента, разделением текста на смысловые блоки абзацами.

Глава 2. «Материал и методы» показывает, что диссертант уверенно владеет широким арсеналом методов современной клеточной биологии. Диссертант последовательно описывает использованные в работе метод определения размера

генома методом проточной цитофлуорометрии, способ исследования полиморфизма геномов с помощью ПЦР-анализа по методу Vos et al. (1995), метод разделения продуктов ПЦР-реакции путем электрофореза в акриламидном геле, методы клонирования амплификатов в векторах pTZ57r/t и pJet2.1. Далее описывается схема экспериментов с использованием метода дот-гибридизации и гибридизации по Саузерну. Затем подробно, со знанием дела, описывается техника получения препаратов хромосом трематод (объект, редко исследуемый цитогенетиками) и их окраски нуклеотид-специфичными флуорохромами, а также метод FISH-гибридизации, использовавшийся для физического картирования клонированных последовательностей. Метод выявления активных районов ядрышковых организаторов с помощью азотнокислого серебра в этой главе по недосмотру не описан.

Завершается глава описанием методов биоинформатики, использованных диссертантом для анализа имиджей и поиска гомологии между клонированными и секвенированными в работе последовательностями и последовательностями из нескольких баз данных.

К недостаткам главы «Материалы и методы» я бы отнес недостаточно подробное описание метода выявления последовательностей, фланкирующих последовательность 7-5. Непонятно, чему комплиментарны праймеры 7\_5OuF (5'-ATTAGGCAAAGTCGAACCAAC-3') и 7\_5OuR (5'-AAAGGTTAGCCCTACGAAAGT-3') и почему с их помощью удастся выявить фланкирующие последовательности вставки в клоне 7\_5 ?

Это частное замечание, а в целом количество и разнообразие методов, которыми владеет А.И. Соловьева, впечатляет.

Эксперименты, описанные в диссертации в главе «Результаты», выполнены на высоком профессиональном уровне. Видно, что перед нами не рядовое, а уникальное по разнообразию подходов исследование генома и кариотипа трематод, причем выполненное на виде *Himasthla elongata*, представляющем такое семейство паразитических плоских червей, которое до сих пор никогда еще не было исследовано клеточными и молекулярными биологами. Достаточно сказать, что в диссертационной работе впервые определен размер генома представителя

семейства Himasthliidae, впервые описан кариотип этого вида – первого представителя этого семейства, исследованного кариологически. До сих пор при исследовании кариотипов трематод использовался, да и то изредка, только один метод дифференциального окрашивания – С-бэндинг (Shot, Grossman, 1981; Richard, Voltz, 1987; Bombarova et al., 2015). В представленной сегодня к защите диссертации впервые представлены результаты дифференциального окрашивания хромосом АТ-специфичными (DAPI) и GC-специфичными флуорохромами (хромомицин А<sub>3</sub>), впервые с помощью метода дифференциального окрашивания азотнокислым серебром (Ag(NOR) и FISH-гибридизации у представителя этого семейства картированы гены 45S рРНК – существенно, что на хромосомах червей класса Trematoda (около 18 тыс. видов) гены 45S рРНК с помощью FISH картированы менее чем у 10 видов (Hirai et al., 1989; Reblanova et al., 2011; Zadesenets et al. 2012; Bombarova et al., 2015).

В основной части работы, посвященной исследованию феномена внутриклональной изменчивости геномов и возможной роли в этом ДНК-транспозонов и ретротранспозонов, также достигнуты большие успехи. Прежде всего, диссертантом показано, что паттерн AFLP-фрагментов разный у редий, выделенных из одного моллюска. Диссертант предполагает, что есть основания считать, что редии из одного моллюска – это потомки одного мирацидия и рассматривает их как представителей одной клональной популяции или пула. (стр. 31). Хотелось бы знать, что об этом думают паразитологи – по их данным, возможно ли заражение в природе одного моллюска несколькими мирацидиями ?

В качестве пожелания и, в виду важности проблемы внутриклональной изменчивости геномов, в будущем диссертанту имеет смысл повторить этот эксперимент в работе с редиями, выделенными из одного моллюска, искусственно зараженного в лаборатории заведомо одним мирацидием.

Исследуя полиморфизм геномов редий, диссертант впервые показал присутствие в геномах представителей этого вида и этого семейства трематод нескольких типов ретротранспозонов, таких как copia, gypsy, CR1, Idio, RTE, BEL, Tad1, Daphne, а также ДНК-транспозонов семейств MuDR и Harbinger. Выделенные из генома *Himasthla elongata*, фрагменты этих транспозонов были диссертантов клонированы и секвенированы, был проведен поиск гомологичных

последовательностей в базах данных - все это серьезный задел для будущих исследований.

В качестве пожелания к этому разделу работы, я бы рекомендовал диссертанту не ограничиваться идентификацией транспозона с точностью до семейства – многие из семейств транспозонов очень гетерогенны и разные их варианты встречаются в геномах представителей разных филогенетических ветвей. Имея ввиду реальную возможность горизонтального переноса транспозонов и сложный, со многими хозяевами жизненный цикл *Himasthla elongata* хотелось бы знать – CR1 повтор, найденный у *Himasthla* ближе к CR1-повтору птиц или кого-то из представителей других классов эукариот; секвенированный диссертантом участок транспозона Idio1 родственен Idio-транспозону моллюсков или кого-то другого; MuDR-транспозон трематод насколько близок к MuDR-транспозону растений и описаны ли были ранее MuDR-транспозоны в геномах трематод?

Очень интересно, что в представленной к защите работе удалось впервые показать, что выявленные в геноме трематоды фрагменты транспозона CR1 в значительных количествах представлены в транскриптом. Это важное обстоятельство, которое действительно делает весьма вероятным как участие так называемых non-LTR-транспозонов в регуляции работы генома и, возможно, может быть предусловием для транспозиций CR1-повтора.

Исследуя внутриклональный полиморфизм геномов диссертант несколько модифицировал методику и показал, что метод AFLP может успешно использован в работе по исследованию индивидуальных характеристик геномов таких микроскопических объектов, как редии – важное методическое достижение.

Несколько конкретных вопросов по этому разделу. На рис. 6 диссертации (стр. 33) представлена номенклатура церкарий из разных клональных популяций (A1\2, A2\16 B1\2 и т.д.) – тут все понятно. Но в работе неоднократно описываются результаты, полученные при сравнении образцов, маркированных как A и A', B и B'. Что означает эта маркировка?

В разделе «Материалы и методы» диссертант пишет, что измерение интенсивности сигналов после дот-гибридизации «проводили на цифровых изображениях окрашенных блотов с помощью программы Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)» (стр. 40). Измерения – вещь важная. Надо было бы

рассказать о способе измерений более подробно – какая точность измерения, какова ошибка. И, конечно, не кажется удачной выбранная форма представления результатов этих измерений, без численных значений и ошибок, в виде 9 кольцевых диаграмм, каждая из которых разделена на 18 цветных сегментов – сопоставить между собой диаграммы представляется задачей непосильной. То же можно сказать и о кольцевой диаграмме на рис. 24 (стр. 64), которая должна показывать частоту встречаемости разных семейств транспозонов в транскриптоме – она совершенно не читаема.

Обсуждение полученных результатов проведено квалифицировано, со знанием и пониманием особенностей объекта исследований и возможностей использованных в работе методов. Единственное, что вызвало у меня недоумение, это ничем не обоснованная попытка автора обсуждать особенности кариотипа *Himasthla elongata* на основании не согласующейся с современными данными таксономической системы. Диссертант пишет (стр. 70): «С выходом публикации о новой филогении эхиностоматид (Tkach et al, 2016) химаслин выделили в отдельное семейство Himasthlidae. Однако многие авторы придерживаются старой классификации (Kostadinova, 2005), в соответствии с которой род *Himasthla* относят к семейству Echinostomatidae Looss, 1899. Далее в обсуждении речь пойдет о старом варианте филогении. *Himasthla elongata*..» - Почему о старом ??? Тем более, что упомянутая Костандинова совсем не придерживается «старого варианта системы», а является одним из авторов нового варианта (см.: Tkach et al., 2016), согласно которому род *Himasthla* не только не входит в сем. Echinostomatidae, но и отстоит от него довольно далеко на филогенетическом древе, не являясь сестринской для Echinostomatidae группой, что делает рецензируемое исследование и его результаты еще более интересными и значимыми.

Это частные замечания, которые обусловлены, большей частью, тем, что работа исключительна разнообразна по экспериментальным подходам. В целом, актуальность, научная новизна, обоснованность экспериментальных подходов и выводов из предпринятого А.И. Соловьевой исследования у меня никаких сомнений не вызывают – все представленные данные оригинальны и раскрывают новые черты организации генома и хромосом трематод. Сделанные диссертантом

заклучения о месте и роли транспозонов в геноме трематоды *Himasthla elongata* имеют большое значение для всех биологов, работающих в области клеточной биологии.

Основные положения, вынесенные диссертантом на защиту, касающиеся изменчивости генома вида *Himasthla elongata*, особенностей организации кариотипа этого вида и позиций в геноме последовательностей, комплементарных клонированным в работе фрагментам ДНК LINE-повторов, обоснованы результатами проведенных экспериментов, микрофотографиями, квалифицированно проведенным обсуждением.

Выводы работы также обоснованы результатами экспериментальной работы.

Текст автореферата адекватно передает содержание работы. Результаты работы опубликованы в трех статьях в журналах из списка ВАК, одна из которых в авторитетном журнале *Journal of Experimental Zoology* (в списке работ автора скрыт под безликой аббревиатурой JEZ), они неоднократно докладывались на российских и международных симпозиумах, достаточно широко обсуждались и получили высокую оценку специалистов в области биологии клетки и цитогенетиков.

Сделанные мной в настоящем отзыве замечания дискуссионны и касаются лишь небольшой части этой, в целом очень интересной и очень технически сложной работы. Как квалификационная работа претендента на ученое звание кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология», работа А.И. Соловьевой удовлетворяет самым жестким критериям, прилагаемым к кандидатским диссертациям: обзор литературы показывает, что диссертант хорошо ориентируется в теме исследования, проведенные эксперименты демонстрируют современную и разнообразную методическую подготовку и большое число цитологических и молекулярно-генетических методов, которыми владеет диссертант. Результаты оригинальны, интересны с общенаучной точки зрения, они раскрывают перед нами новые, в чем-то неожиданные стороны организации генома и хромосом такого важного объекта, как представитель паразитических трематод *Himasthla elongata*.

Перед нами высокопрофессиональное цитологическое исследование, демонстрирующее разностороннюю профессиональную подготовку диссертанта, как специалиста в области биологии клетки. Выводы работы вполне обоснованы.

Резюме: исследование Анны Ивановны Соловьевой «Мобильные элементы участвуют в образовании клональной изменчивости *Himasthla elongata* (Trematoda, Himasthlidae)», представленное к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология, является оригинальным научным исследованием, характеризуется новизной и вносит заметный вклад в изучение особенностей организации и функционирования генома и хромосом паразитических беспозвоночных. Работа обладает несомненной теоретической и практической значимостью, она соответствует критериям, установленным в пунктах 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Тем самым, Анна Ивановна Соловьева заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология,

Заведующий лабораторией биосистематики и цитологии

БИН РАН, доктор биологических наук, профессор

По специальностям 03.00.15 Генетика;

03.00.25 Гистология, цитология, клеточная биология

Александр Викентьевич Родионов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН (БИН РАН)

197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2

тел. 8-921-774-0792

[avrodionov@mail.ru](mailto:avrodionov@mail.ru), [avrodionov@binran.ru](mailto:avrodionov@binran.ru)

Подпись руки  
ЗАВЕРЯЮ

ОТДЕЛ РОДИОНОВ  
Ботанический институт  
им. В.Л. Комарова  
Российской академии наук

