

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию

Соловьевой Анны Ивановны

«Мобильные элементы участвуют в образовании клональной изменчивости *Himasthla elongata* (Trematoda, Himasthlidae)»,
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Структурная и функциональная геномика представляют собой взаимозависимые направления развития изучения геномов. Мобильные элементы генома, способные перемещаться из сайта в сайт либо в процессе прямого вырезания вставки ДНК (ДНК-транспазоны) - либо путем транскрипции элемента, обратной транскрипции РНК, с образованием ДНК-копии и ее внедрением в другое мест генома (диспергированные повторяющиеся элементы), могут служить факторами, приводящими к возникновению геномного разнообразия, не сцепленного с половым процессом. В связи с этим, возникает необходимость исследовать структуру и организацию в геноме таких мобильных элементов и механизмы их влияния на биологические функции содержащих их организмов.

Решению этой важной проблемы и посвящена диссертационная работа Соловьевой А.И. **Цель** работы - выявить изменчивость в геноме партенит *H. elongata* методом S-SAP и охарактеризовать изменяющиеся последовательности.

Для достижения сформулированной цели определены четыре основных **задачи**: генотипирование партенит *H. elongata* методом S-SAP и характеристика нуклеотидных последовательностей полиморфных и консервативных зон, составляющих профиль получаемых фрагментов ДНК; анализ распределения клонированных фрагментов в паттернах генотипирования методом дот-блота; поиск нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов мобильных элементов в транскриптоме *H. elongata* и исследование распределения выявленных клонированных фрагментов в геноме *H. elongata* методом FISH.

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

Диссертация Соловьевой А.И. написана по традиционному плану и содержит все необходимые разделы – введение, обзор литературы, экспериментальную часть, в которой изложены методы исследования и представлены результаты исследования, а также обсуждение, выводы и список литературы, содержащий 141 публикацию. Работа изложена на 116 страницах и иллюстрирована 65 рисунками, 5 таблицами и содержит 2 приложения.

Во Введении обоснована актуальность выбранной для исследования проблемы, сформулированы цель и конкретные задачи исследования и положения, выносимые на защиту, определена научная новизна полученных результатов, их теоретическое и практическое значение, а также отмечен вклад автора в планирование работы над диссертацией, в получение экспериментальных данных и их анализ, написание статей по результатам исследований, в том числе и рукописи диссертации.

Обзор литературы написан ясно, логично и очень конкретно, хорошим языком. В нем приведен тщательный и всесторонний анализ состояния исследований в изучаемой научной области. Дана общая характеристика мобильных элементов генома эукариот, подробно описаны ретроэлементы и ДНК-транспозоны, описаны влияние мобильных элементов на геном и их активность в функционировании генома, а также распределение мобильных элементов в геномах эукариот и связь с половым размножением. Далее изложена информация об объекте исследования, в качестве которого выбран 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 вариабельность партенит. Отмечено: (1) наличие диплоидного партеногенеза не противоречит возможности фиксации и передачи всех возникших в геноме изменений; (2) на ряде видов трематод показано существование так называемой клональной изменчивости, а именно изменчивости партеногенетических личинок, для которых предполагали одинаковые генотипы, то есть клональность. На основании этого предположения: источником клональной изменчивости могут служить

повторяющиеся элементы генома, Соловьевой Анной Ивановной была выполнена и представлена на защиту диссертационная работа.

Экспериментальная часть работы Соловьевой А.И. выполнена на высоком методическом уровне с применением методов и комбинированных методических подходов молекулярной, клеточной и компьютерной биологии, что обеспечило получение важных и достоверных результатов. Среди них: выделение хромосомной ДНК из отдельных церкарий и сравнение ДНК, потомков одного мирацидия, методом AFLP; анализ ДНК методом гельэлектрофореза в агарозе и полиакриламидном геле; определение размера генома *H.elongata* методом проточной цитофлуориметрии; S-SAP - анализ (выявление полиморфизма с помощью секвенирования специфично амплифицированных последовательностей); молекулярное клонирование в клетках *E.coli*; дот-гибридизация и гибридизация по Саузерну; флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), включая получение ядер и метафазных хромосом, а также комбинированную окраску препаратов хромомицином А3 (СМА3) и DAPI и флуоресцентную микроскопию. 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.

Экспериментальные данные проанализированы и сгруппированы в шести разделах и представляют собой результаты обобщения данных, полученных при решении поставленных в работе задач. Полученные Соловьевой А.И. данные несомненно являются новыми. Впервые определен размер генома и получены данные о кариотипе трематод *H.elongata*, в котором выявлен полиморфизм в морфологии хромосом и в их окраске дифференциальными красителями. Продемонстрирована пригодность метода S-SAP для генотипирования единичного церкария. Такая техника может применяться и для других объектов с малым количеством материала. Охарактеризованы нуклеотидные последовательности, составляющие консервативные и полиморфные зоны в паттернах генотипирования церкарий, полученных методом S-SAP. Впервые в геноме *H.elongata* выявлены фрагменты ретроэлементов семейств CR1, RTE,

BEL, соріа и, таким образом, определены потенциальные носители клональной изменчивости. Проведен анализ последовательностей, составляющих картины генотипирования партеногенетических личинок. Впервые показано, что фрагменты кодирующей некодирующей части ретроэлемента CR1 (non-LTR) представлены в транскриптом в значительных количествах, но в разных транскриптах. Локализация кодирующей и некодирующей частей CR1 (non-LTR) впервые показана в разных частях хромосом: факультативном или конститутивном гетерохроматине. Эти данные расширяют представления о связи РНК и повторяющихся последовательностей генома, а также их роли в упаковке генома его нестабильности и эволюции.

Значение результатов исследования Соловьевой А.И. необходимо рассматривать в двух аспектах: теоретическом и практическом. Во-первых, работа расширяет представления о роли мобильных элементов в геноме, а также способствует пониманию механизмов появления полиморфизма при отсутствии полового процесса. Во-вторых, объект исследования принадлежит к классу Trematoda, среди которых много возбудителей опасных заболеваний. В работе получены достоверные данные о наличии клональной изменчивости у трематод *H. Elongata*, которые не представляют опасности для человека и поэтому могут являться удобной моделью для разработки противопаразитарных средств.

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

Материалы диссертации представлены в 12 печатных работах, в их числе 3 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 Соловьевой Анны Ивановны в полной мере отражает основные результаты и выдвигаемые на их основе положения и соответствует требованиям ВАК РФ.

В целом диссертационная работа Соловьевой Анны Ивановны, несомненно, заслуживает положительной оценки. Основная цель исследования достигнута. Поставленные задачи решены, получены новые данные, выводы сформулированы в соответствии с положениями, вынесенными на защиту. Принципиальных замечаний и возражений работа не вызывает. К автору работы есть вопрос и ряд замечаний по рукописи диссертации, в основном редакционного характера, которые не влияют на общую положительную оценку работы.

Вопрос.

Какие планы дальнейших исследований у автора работы, которая уже внесла весомый вклад “в то, что может привести к новой революции в исследованиях генома: выявлению связи РНК и повторяющихся последовательностей”?

Замечания, в основном касаются оформления рукописи, привожу некоторые из них:

1. Во всех разделах во многих предложениях игнорируются необходимые существительные, даже при формулировке цели работы: “...охарактеризовать изменения последовательности (чего? или какой?)”.
2. Говорить “клонировать в вектор”, а, тем более, писать так - неверно. Писать надо: “встраивать в вектор” или “клонировать в составе вектора”, т.к. клонируют в клетках, а в вектор встраивают.
3. В Выводах пункт 2 и 4 сформулированы как суммирование сделанного, а не как заключение.
4. Рукопись диссертации следовало тщательнее “вычитать”, поскольку встречаются не только простые опечатки (пропуски букв, повтор слов и др.), несогласования в падежах и др., но и неправильные отсылки к рисункам (например стр.36 раздел 2.7)

Заключение

Все вышесказанное позволяет заключить, что по своей актуальности, новизне поставленных и решенных задач, научному и практическому значению диссертационная работа Соловьевой Анны Ивановны «Мобильные элементы

участвуют в образовании клональной изменчивости *Himasthla elongata* (Trematoda, Himasthlidae)», 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 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

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

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

«03» апреля 2017 г.

Н.В. Цымбаленко

