

ЗАЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **СОЛОВЬЕВОЙ АННЫ ИВАНОВНЫ**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение Диссертационного совета от 21 апреля 2017 года № 221/399

О присуждении **СОЛОВЬЕВОЙ АННЕ ИВАНОВНЕ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Мобильные элементы участвуют в образовании клональной изменчивости *Himasthla elongata* (Trematoda, Himasthlidae)»

По специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Принята к защите 23.12.2016 г., протокол № 216/395, Диссертационным советом

Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), 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 Соловьева Анна Ивановна, 1989 г.р., в 2013 году окончила биологический факультет Санкт-Петербургского государственного университета с присвоением квалификации «магистр биологии». Работа выполнена в порядке прохождения очной аспирантуры (сроки: 23.08.2013-22.08.2016) Института цитологии РАН под руководством проф., д.б.н. О.И. Подгорной. Диссертационная тема и план утверждены Ученым советом ИНЦ РАН 14.03.2014 протокол № 186/897. В Институте цитологии РАН Соловьева А.И. работает с 2009 г., с ноября 2016 г. по настоящее время является младшим научным сотрудником Группы неcodирующей ДНК Лаборатории морфологии клетки.

Диссертация выполнена в Группе неcodирующей ДНК Лаборатории морфологии клетки Института цитологии РАН.

Научный руководитель:

Подгорная Ольга Игоревна, доктор биологических наук, профессор, заведующая Группой некодирующей ДНК Лаборатории морфологии клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института 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 научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».
2. **Александр Викентьевич Родионов**, доктор биологических наук, профессор, заведующий Лабораторией биосистематики и цитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук.

Дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация:

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск) в своем отзыве (заключение подготовлено заведующим Лаборатории сравнительной геномики ФГБУН ИМКБ СО РАН, кандидатом биологических наук, Владимиром Александровичем Трифоновым и утверждено директором ИМКБ СО РАН, академиком Игорем Федоровичем Жимулевым) указала, что диссертационная работа является законченным самостоятельным 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 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология», а ее автор заслуживает искомой ученой степени кандидата биологических наук и дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 12 опубликованных работ по теме диссертации, 3 статьи (в объеме 3 печатных листов) в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций и 9 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*. 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 разделения продуктов реакции TID. Установлено, что консервативные зоны содержат последовательности ретроэлементов без длинных концевых повторов (LTR, Long Terminal Repeats), в то время как полиморфные зоны обогащены последовательностями ретротранспозонов, несущих LTR. doi: 10.1134/S1990519X13060126
3. **Solovyeva A.I.**, Stefanova V.N., Podgornaya O.I., Demin S.Iu. 2016. Karyotype features of trematode *Himasthla elongata*. Molecular Cytogenetics. 9: 34. В статье приведен протокол получения и анализа хромосом *H. elongata*. Определен состав кариотипа (2n=24), приведены морфометрические данные хромосом, обнаружен полиморфизм блоков конститутивного гетерохроматина, а также распределения окраски АТ- и ГЦ-специфичных флуорохромов. Создан банк изображений каждой из хромосом для упрощения их идентификации. Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с зондом к 18S рибосомной ДНК выявлены ядрышковые организаторы на хромосомах 3, 6 и 10. Это

соотносится с данными, полученными окрашиванием препаратов азотнокислым серебром. По числу хромосом в кариотипе ($2n = 24$) *H. elongata* несколько отличается от ранее изученной родственной группы эхиностоматид ($2n = 14-22$). doi: 10.1186/s13039-016-0246-8.

4. **Solovyeva A. I.**, Galaktionov N. K., Podgornaya O. I. Polymorphisms and mobile elements in trematode *Himasthla elongata* parthenitae. EMBL Symposium: The Mobile genome: Genetic and Physiological impacts of transposable elements. Сборник тезисов докладов, стр. 160. Гейдельберг, 2015 г. В работе посредством дот-гибридизации проведен анализ последовательностей, составляющих картины генотипирования партеногенетических личинок *H.elongata*. Зондами служили наборы продуктов S-SAP трех диапазонов длины: 800-1000 п.н., 500-700 п.н. и 300-500 п.н. При анализе сигналов гибридизации выявили, что картины гибридизаций отличаются для разных гибридизационных проб, а также соотношение интенсивности точек на блотах неодинаково для разных личинок на внутриклональном и межклональном уровнях. Это подтверждает наличие полиморфизма в геномах партенит и указывает на существование геномных перестроек.

5. **Соловьева А. И.**, Галактионов Н. К., Горбушин А. М., Подгорная О. И.. Полиморфизм распределения последовательностей мобильных элементов в геномах партенит *Himasthla elongata*. V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. Сборник тезисов докладов, стр. 58. Санкт-Петербург, 2016 г. В работе исследовали последовательности ретроэлементов, обнаруженных при генотипировании церкарий *H.elongata*. Описаны ретроэлементы семейств CR1, RTE, BEL и SR2. Методом флуоресцентной *in situ* гибридизации выявлено дисперсное распределение зондов к CR1- подобным и кластеризацию зондов к BEL- подобным ретроэлементам. Компьютерный анализ показал наличие гомологичных клонированным фрагментам последовательностей в транскриптом *H.elongata*. Доказано также, что фрагменты кодирующей и некодирующей частей CR1 ретроэлемента (non-LTR) представлены в транскриптом в значительных количествах, но в разных транскриптах.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора биологических наук, профессора, директора ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, **Глупова Виктора Вячеславовича** и кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Лаборатории экологической паразитологии ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН **Антон Викторовича Кривопалова**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Лаборатории паразитологии ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, **Наталии Ильиничны Юрловой**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Кандидата биологических наук, научного сотрудника Беломорской Биологической Станции «Картеш» ФГБУН Зоологического института Российской академии наук **Кирилла Евгеньевича Николаева**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Доктора биологических наук, профессора, заведующего Кафедрой зоологии и экологии животных, декана Факультета естественных наук, медицинского и психологического образования ФГБОУ ВПО «Псковского государственного университета», **Владимира Викторовича Прокофьева**. Отзыв положительный, без замечаний.
5. Доктора биологических наук, профессора, заведующего лабораторией по изучению паразитических червей и протистов ФГБУН Зоологического института Российской академии наук **Кирилла Владимировича Галактионова**. Отзыв положительный, без замечаний.
6. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Лаборатории организации генома ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук, **Серафимы Константиновны Семеновой**. Отзыв положительный, без замечаний.
7. Кандидата биологических наук, научного сотрудника Лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» **Ольги Алексеевны Ефимовой**. Отзыв положительный, без замечаний, содержит вопрос: «...Автор обнаружил три пары хромосом, несущих ядрышковые организаторы (ЯО). Есть ли информация о характере распределения ЯО в кариотипах родственных видов?».

В деле имеется 1 справка о практической ценности работы:

- справка о практической значимости результатов диссертационной работы А.И. Соловьевой и об их использовании в образовательном процессе для студентов кафедры цитологии и гистологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет». Справка утверждена первым заместителем декана биологического факультета СПбГУ доктором биологических наук, профессором **Александрой Давидовной Харазовой**.

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук, **Н.А. Михайлова**, ВРИО директора ИНЦ РАН
2. Доктор биологических наук **С.О. Скарлато**, зам. дир. и зав. лаб. ИНЦ РАН, куратор Совета;
3. Доктор медицинских наук, профессор, **М.М. Шавловский**, член Совета;
4. Доктор биологических наук, профессор, **О.И. Подгорная**, научный руководитель;
5. Кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры цитологии и гистологии биологического факультета СПбГУ **Н.К. Галактионов**.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной и 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 мобильные элементы участвуют в формировании генетического разнообразия клонов партенит и церкарий *H. elongata* при бесполом размножении;

предложен оригинальный научный подход для выявления изменчивости церкарий *H.elongata*

доказано, что метод S-SAP пригоден для генотипирования одной личинки, имеющей микроскопические размеры. Подобная техника может применяться и для других объектов с малым количеством материала. В процессе анализа нуклеотидных последовательностей, клонированных из продуктов генотипирования, выявлены фрагменты ретроэлементов семейств CR1, RTE, BEL, copia и, таким образом, определены потенциальные маркеры

клональной изменчивости. Доказано также, что фрагменты кодирующей и некодирующей частей CR1 ретроэлемента (non-LTR) представлены в транскриптом в значительных количествах, но в разных транскриптах.

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 современные представления о роли мобильных элементов в геноме;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных молекулярных и микроскопических, методов, включающий флуоресцентную микроскопию, рестрикцию и различные варианты ПЦР, включая S-SAP, гибридизацию нуклеиновых кислот, молекулярное клонирование, секвенирование, различные типы электрофорезов, включая секвенирующий, выделение ДНК из малых количеств материала, *in vitro* культивирование партенит *H. elongata*, а также методы анализа и обработки иммунофлуоресцентных изображений и анализ данных методами биоинформатики;

изложены аргументы, основанные на полученных экспериментальных фактах в пользу гипотезы об участии мобильных элементов в формировании генетической изменчивости партеногенетических личинок трематод;

раскрыты особенности кариотипа *H. elongata*, выявлен полиморфизм блоков конститутивного гетерохроматина, а также распределения окраски AT- и ГЦ-специфичных флуорохромов, представлены новые последовательности транспозонов семейств CR1, RTE, BEL, copia, MuDR и Harbinger;

изучены профили вариабельности партеногенетических личинок трематоды *H. elongata*, определен состав нуклеотидных последовательностей из профилей S-SAP, впервые описаны кариотип *H. elongata* и характер распределения некоторых клонированных ретроэлементов на хромосомах трематоды;

проведена оценка возможности использования метода S-SAP для выявления генетического полиморфизма партеногенетических личинок трематоды *H. elongata*.

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

определены перспективы возможного практического применения результатов исследования для разработки противопаразитарных фармакологических препаратов. Вид

H. elongata безопасен для человека и является удобной моделью для изучения механизмов клональной изменчивости партеногенетических личинок трематод.

создана теоретическая база, которая расширяет представления о роли мобильных элементов в геноме. Результаты работы важны для понимания механизмов появления генетического полиморфизма при отсутствии полового процесса;

представлены новые данные, показывающие, что основной вклад в картины генотипирования партеногенетических личинок *H.elongata* вносят non-LTR ретроэлементы; материалы диссертации используются в курсе лекций «Спецглавы клеточной биологии», разработанном для кафедры цитологии и гистологии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицируемом оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и соответствует поставленным в работе задачам, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов анализа данных;

теория об участии мобильных элементов в возникновении полиморфизма партеногенетических поколений трематод построена на известных, проверяемых данных, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе данных современной литературы, на полученных ранее в Группе не кодирующей ДНК Лаборатории морфологии клетки ИНЦ РАН данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике;

установлено, что результаты работы согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обосновано;

использованы современные экспериментальные подходы (разные варианты ПЦР, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), гибридизация ДНК по Саузерну и дот-гибридизация, анализ полученных результатов методами биоинформатики с использованием современных программных пакетов и баз данных (RepeatMasker, Tandem Repeat finder, SINE Base, ImageJ, BLAST, Usearch)).

Личный вклад автора состоит в:

непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации данных, полученных с помощью современных методов клеточной и молекулярной биологии. Автор принимал непосредственное участие

в апробации результатов исследований на всероссийских и международных научных конференциях, в подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации.

Диссертация, посвященная исследованию участия мобильных элементов генома в проявлении клональной изменчивости партеногенетических поколений морской трематоды *Himasthla elongata*, является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной биологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей большое значение для понимания механизмов возникновения генетической изменчивости, не сцепленной с половым процессом. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных Анной Ивановной Соловьевой работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года), а ее автор, Анна Ивановна Соловьева, безусловно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

На заседании 21 апреля 2017 г. Диссертационный совет Д 002.230.01 принял решение **присудить Анне Ивановне Соловьевой** ученую степень кандидата биологических наук по специальности «Клеточная биология, цитология, гистология» (03.03.04).

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 9 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, из 24 человек входящих в состав Диссертационного совета, – проголосовали:

«ЗА» - 17, «ПРОТИВ» - нет, недействительных бюллетеней нет.

Заместитель председателя
Диссертационного совета Д 002.230.01
доктор биологических наук, профессор

С.Н. Борхсениус

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.230.01
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

« 24 » апреля 2017 г.