

ОТЗЫВ
официального оппонента о диссертационной работе

Даугавет Марии Аркадьевны

«Белки Оболочников (Tunicata), специфичные для двух типов клеток крови: доменная организация и происхождение»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертационная работа Даугавет Марии Аркадьевны посвящена изучению ранее неизвестных белков клеток крови представителей низших хордовых - оболочников (п/тип Tunicata, тип Chordata). По данным молекулярной филогении оболочники, но не ланцетник (п/тип Cephalochordata) являются наиболее близкими к позвоночным и образуют к ним сестринский таксон (Delsuc et al., 2006). В раннем развитии, на стадии личинки, оболочники обладают нервой трубкой и хордой. Оболочники во взрослом состоянии – это, в основном, сидячие, часто колониальные животные, по типу питания – фильтраторы. Кровеносная система представлена сетью лакун, имеется сердце, которое направляет ток крови попеременно то к переднему, то к заднему концу (Konrad, 2016). Способны образовывать колонии, которые могут отличаться генетически. В группе оболочников три класса – асцидии, сальпы и аппендикулярии. Асцидии, являющиеся модельным объектом многих исследований, были выбраны в качестве объекта и в данной работе.

В эволюционном плане представляет большой интерес выяснение состава крови, строение и функции ее форменных элементов, а также их белковый состав у животных разных групп, относящихся к разным уровням организации. Кровь как ткань появляется среди беспозвоночных у низших целомических животных - немертин. Она имеет кровяные тельца, содержащие различные дыхательные пигменты, в том числе гемоглобин. У полихет кровь содержит железосодержащее вещество, близкое к гемоглобину, у некоторых видов – другой аналог гемоглобина – хлорокруорин, эти вещества растворены в жидкости крови. У многих полихет имеются эритроциты. Кровь моллюсков содержит гемоцианин – дыхательный пигмент из группы металлопротеинов - медьсодержащий функциональный аналог гемоглобина, растворенный в плазме и придающий крови голубоватый цвет. У ряда моллюсков имеются эритроциты, содержащие гемоглобин. Гемоцианин встречается и в крови членистоногих. У членистоногих кровь содержит клетки. У кишечнодышащих, относящихся к полуходовым (тип Hemichordata) форменные элементы крови представляют собой очень мелкие частицы умеренной электронной плотности. У иглокожих (тип Echinodermata)

кровеносная система образована лакунами, содержит клетки - амебоциты, переносит питательные вещества. Ланцетник имеет замкнутую кровеносную систему, очень малое количество клеточных элементов.

Оболочники отличаются наибольшим разнообразием клеточного состава крови по сравнению с другими беспозвоночными. Клетки крови асцидий представлены несколькими морфологическими типами, у разных видов их известно – от 4 до 12.

Актуальность темы диссертации. заключается в том, что оно посвящено описанию и характеристике новых белков определенных типов клеток крови низших хордовых - оболочников. Характеристика белков на молекулярном уровне позволяет сопоставить их с белками крови других беспозвоночных, позвоночных и человека. Таким образом, работа решает вопросы молекулярной филогении. В то же время она дает материал для лучшего понимания развития крови как ткани и эволюции защитных систем.

Не меньший интерес представляет эволюция клеточных элементов крови. Для беспозвоночных характерна мультифункциональность клеток и широкий спектр функций. Вариабельность количества типов клеток крови у разных видов асцидий может быть связана с видовыми особенностями.

Некоторые особенности крови беспозвоночных отмечались очень давно. Уже в XVIII веке, в 1795 году было замечено, что кровь моллюсков имеет голубой цвет. В частности, это отмечал знаменитый французский естествоиспытатель Жорж Кювье. В 1833 году венецианский химик Бартоломео Бицио в составе крови морских брюхоногих моллюсков обнаружил медь. В 1878 году бельгийский физиолог Леон Фредерик выделил голубой пигмент из крови осьминога и предложил название этого пигмента — «гемоцианин».

Гемоцианин – это медьсодержащий дыхательный пигмент (из группы металлопротеинов). К дыхательным пигментам относятся также хлорокруорин (зеленый пигмент) и гемэритрин (фиолетовый пигмент), встречающиеся у беспозвоночных.

Изучается возможность применения гемоцианина в медицине как компонента противоопухолевых вакцин. При образовании коньюгатов с опухолевыми антигенами он существенно повышает их иммуногенность. Этот адьювант способствует преодолению иммунологической толерантности или усиливает иммунный ответ на ганглиозидные антигены (GM2, GD2, GD3). Обнаружен высокий уровень Т-клеточного иммунного ответа при использовании коньюгатов гемоцианина с муцином. Предполагается, что они также могут применяться в технологии получения дендритных вакцин.

Поскольку фенолоксидазы, присутствующие в морулярных клетках асцидий, имеют сходство с гемоцианинами (медь-содержащие белки III типа), то перспективным является изучение крови асцидий с целью выяснения защитных свойств ее компонентов и их возможного лекарственного применения.

Среди морских организмов туниката являются объектом интенсивного изучения защитных реакций и иммунного ответа (Franchi, Ballarin, 2017). Оболочники оказались особенно успешными в разработке перспективных методов лечения рака, эти соединения проходят клинические испытания в Европе и США (Cooper, Yao, 2012).

Общая характеристика диссертационной работы. Диссертация изложена по традиционному плану, содержит 4 главы: Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, за которыми следуют заключение, выводы и список литературы, который включает 253 источника, преимущественно иностранные. Работа изложена на 135 страницах, содержит 21 рисунок, 2 таблицы и 13 приложений.

Исследованный вид асцидий - *Styela rustica*. В задачи исследования входило выявление и характеристика еще не описанных мажорных белков, специфичных для двух наиболее многочисленных клеток крови *S. rustica* – морулярных клеток и гиалиноцитов. Для решения поставленных задач докторант использует широкий арсенал методов молекулярной биологии и информатики.

Получены новые важные данные. Показано, что аминокислотная последовательность на основе полного транскрипта **туфоксина** (белка морулярных клеток) может содержать четыре функциональных домена. Это два EGF-подобных кальций связывающих домена, тромбоспондиновые повторы первого типа и тирозиназный домен. Поскольку морулярные клетки выделяют гранулы путем экзоцитоза, сделано предположение, что тирозиназный домен в составе туфоксина участвует в склеротизации туники, а наличие тромбоспондиновых повторов первого типа может обеспечить взаимодействие туфоксина с другими компонентами внеклеточного матрикса.

Тирозиназный домен туфоксина имеет ключевые аминокислоты в активном центре, характерные для тирозиназ альфа-подтипа. Тирозиназные домены туфоксина кластеризуются на филогенетическом древе с тирозиназными доменами гемоцианинов моллюсков, которые также относятся к альфа-подтипу. Это объясняет отличие туфоксина от тирозиназ асцидий описанных ранее, которые схожи с ферментами членистоногих и позвоночных и относятся к бэта и гамма подтипам.

Белки, содержащие одновременно эти два домена, в настоящее время обнаружены только у Оболочников. Более того, докторант впервые обнаруживает эти повторы в медь-связывающих белках III-типа и предполагает, что это является эволюционным приобретением линии Оболочников.

Другой найденный белок – **рустикалин** (белок гиалиноцитов). Анализ последовательности рустикалина проводили методами биоинформатики. Показано, что рустикалин гиалиноцитов асцидий состоит из двух доменов. Кодирующие последовательности этих доменов имеют разное происхождение. Участок ДНК, кодирующий N-концевой домен, имеет эукариотическое происхождение. Тогда как последовательность, кодирующая С-концевой домен, вероятно, имеет прокариотическое происхождение и перенесена в геном асцидий в результате встраивания бактериофага. Как предполагает автор, N-концевой домен способен встраиваться в мембрану бактериальных клеток, а С-концевой домен разрезать слой пептидогликана клеточной стенки. Полученные данные не противоречат предполагаемой иммунной функции рустикалина. Получены результаты, указывающие на происхождение кодирующей последовательности С-концевого домена путём горизонтального переноса гена из бактериального генома. Автор предполагает, что посредником такого переноса послужил бактериофаг, который рекомбинировал с эукариотическим геномом.

Выводы обоснованы и вытекают из полученных результатов.

Новизна и высокая значимость работы заключаются в том, что автор применил широкий набор молекулярно-биологических методов и методов биоинформатики для выявления и характеристики новых белков. Гипотеза о горизонтальном переносе одного из доменов рустикалина является отдельным достижением. Работа такого класса – важный шаг на пути изучения эволюции крови как ткани, ее форменных элементов, белков и их функций от беспозвоночных к высшим хордовым.

Замечания по диссертационной работе. В тексте встречаются терминологические неточности, неудачные выражения и отдельные опечатки. Стр. 6: «обитают в морских водоемах». Обычно говорят «морские животные». Стр. 22: «гемоцитобласти дают начало новым органам». Гемоцитобласти могут давать начало только клеткам новых органов. Стр. 24: «этот тип клеток размножается». Размножаются клетки. Стр. 26: «кислые мукополисахариды». В настоящее время для этих соединений принято название «гликозаминогликаны». Стр. 27 и в других местах: «окрашивание антителами». Корректное выражение –

выявление с помощью антител (иммуноцитохимическое выявление). Стр. 34: «рецептор-апосредованное» вместо «рецепторно-апосредованное».

Неудобная система ссылок на работы авторов в тексте цифрами вместо фамилий, чтобы понять, чья работа, надо заходить в список литературы.

Отмеченные замечания не снижают общей высокой оценки работы.

В порядке дискуссии хотелось бы задать автору некоторые вопросы.

- 1) Какое объяснение можно дать появлению сходных белков – туфоксина у асцидий и гемоцианина у моллюсков? Можно ли объяснить сходство белков в разных группах конвергенцией?
- 2) Какие гипотезы можно выдвинуть о способе проникновения бактериофагов в клетки эукариот?
- 3) Возможно ли определить бактерию, которая выступала донором пептидазного домена рустикалина?

Заключение.

Диссертационная работа М.А. Даугавет «Белки Оболочников (Tunicata), специфичные для двух типов клеток крови: доменная организация и происхождение», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология, выполнена на высоком научно-техническом уровне и самыми современными методами, включая клонирование, секвенирование и обработку данных методами биоинформатики. Проведенное исследование представляет собой законченную научно-квалификационную работу, связанную с выявлением новых белков и их генов и характеристикой их эволюционных отношений. Объем работы очень впечатляет, результаты оригинальны, получены автором самостоятельно и не вызывают никакого сомнения.

Содержание диссертации адекватно отражено в автореферате.

Результаты диссертационной работы, выносимые на защиту, прошли апробацию на 13 отечественных и международных конференциях и опубликованы в виде пяти научных статей в журналах, рекомендованных ВАК (4 иностранные), входящих в международные базы цитирования. М.А. Даугавет является первым автором в 3х из них.

Учитывая актуальность выполненных исследований и их научную новизну, считаю, что представленная диссертационная работа Даугавет М.А. соответствует всем требованиям «Положения о присуждении научных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

кандидата биологических наук, а ее автор Даугавет Мария Аркадьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология».

Профессор кафедры гистологии и
эмбриологии им. проф. А.Г. Кнопре
Санкт-Петербургского государственного
педиатрического медицинского университета,
д.б.н. М.В. Столярова

M. Stolyarova

30.01.2023г.

Столярова Марина Владимировна, д.б.н. (03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология), проф. кафедры гистологии и эмбриологии им. проф. А.Г. Кнопре Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Адрес: Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2, тел. +7 (812) 416-53-14, эл. почта: mvstolyarova@yandex.ru

*Нормальную форму М.В. Столяровой даю в
специалист по гистологии Ему Тимурбеков*

