



**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор ФГБНУ

«Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения  
Российской академии наук»

*А.В. Кочетов*

Академик РАН А.В. Кочетов

**Отзыв ведущей организации**  
**на диссертацию Даугавет Марии Аркадьевны на тему**  
**«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 1.5.3 - «молекулярная биология»

#### **Актуальность диссертационной работы**

Диссертационная работа Даугавет Марии Аркадьевны посвящена установлению функций мажорных белков клеток крови Оболочников (Tunicata).

Оболочники, являясь ближайшим сестринским таксоном по отношению к Позвоночным, интересны тем, что многие молекулярные механизмы сохранились на эволюционно более древнем уровне, чем у Позвоночных. Таким образом, Оболочники представляются прекрасным модельным объектом для изучения эволюции систем органов и генома. Более того, туникаты представляют собой богатую нишу для поиска и описания новых биологически активных агентов. Форменные элементы крови данных животных, гемоциты, представляют большой интерес для изучения, так как они играют важную роль во многих процессах жизнедеятельности Оболочников. Функции основных клеточных типов в крови асцидий подробно описаны, но белковые компоненты, определяющие эти функции не всегда известны. Выявление главных действующих молекул в крови оболочников послужит не только более глубокому пониманию устройства молекулярных процессов туникат, но может также послужить заделом для создания новых лекарственных средств.

#### **Научная новизна исследования**

Даугавет М. А. были описаны два новых белка асцидий и их гомологи, принадлежащие Оболочникам и другим группам многоклеточных. Был идентифицирован белок туфоксин – специфический мажорный компонент морулярных клеток крови, относящийся к альфа-тирозиназам. Автором описаны особенности последовательности туфоксина и предложен прогноз его физиологической функции.

Второй новый белок Оболочников, рустикалин, является химерной последовательностью, часть которой имеет эукариотическое происхождение, а часть произошла путём горизонтального переноса гена бактерий. В данной диссертационной работе автором на примере рустикалина впервые представлены данные, которые указывают на роль бактериофагов, в качестве векторов переноса генов от прокариот к эукариотам. Предложен механизм интеграции бактериофага в эукариотическую хромосому за счёт последовательностей, схожих со специфическим сайтом рекомбинации.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В работе Даугавет М. А. описаны два новых белка, которые синтезируются в клетках крови асцидий. Для туфоксина прогнозируется участие его в склеротизации тканей. Описание новой фенолоксидазы низших Хордовых важно для изучения склеротизации тканей беспозвоночных и в меланизации у Позвоночных и человека.

В работе высказано предположение, что новый белок рустикалин играет роль в защите Оболочника от бактерий. Предполагается, что один домен данного белка способен разрушать мембрану бактерий, а второй расщеплять пептидогликаны их клеточной стенки. Подобный белок может служить базой для создания противобактериального препарата, эффективного против патогенов с устойчивостью к стандартным антибиотикам.

### **Структура и общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация имеет традиционную структуру: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает 253 источника. Работа изложена на 135 страницах, содержит 21 рисунок, 2 таблицы и приложение на 31 странице.

Автором был использован широкий набор молекулярно-биологических, биоинформационических и цитологических методов для поиска и установления нового мажорного белка, специфичного для морулярным клеткам крови асцидии *S. rustica*. Было убедительно показано, что новый белок с массой 48 кДа, его транскрипт и соответствующий ген не был описан ранее. Белок был назван туфоксин *Styela rustica*. Автором было высказано наиболее вероятное предположение, что в туфоксине присутствуют только два рабочих домена: тромбоспондиновый и

тирозиназный. Анализ белковых последовательностей туфоксина и его гомологов, найденных в базах данных, а также анализ литературы, позволили соискателю предположить, что туфоксины близки к тирозиназам альфа-подтипа. Для установления эволюционной истории найденного гена автором был проведен филогенетический анализ последовательности туфоксина, и его ближайших аналогов, полученных из баз данных. Интересным фактом является то, что родственные тирозиназному домену туфоксина последовательности принадлежат представителям весьма различных таксонов: асцидиям, моллюскам, кольчатым червям, грибам и бактериям. Несмотря на то, что тирозиназный домен туфоксинов имеет наиболее близких общих предков среди многоклеточных животных у моллюсков и кольчатых червей, он все же имеет сходство с достоверное сходство с ферментом бактерий. Данный факт может говорить о высокой степени консервативности данного домена. Также было показано, что другой домен туфоксина является домен тромбоспондиновых повторов первого типа, также представленных в организмах эукариот, как и тирозиназный домен. Однако, оба домена в одном белке встречаются только у Оболочников, обуславливая уникальность данного гена туникат. Согласно полученным результатам, автор делает предположение о том, что туфоксин играет роль в склеротизации туники.

Подобная методология была применена автором для выявления белка, специфичного для гиалиноцитов крови Оболочников. В результате автором был выделен новый мажорный белок размером 23 кДа, названный рустикалином. Полноразмерные гомологи рустикалина найдены у других представителей Оболочников, у одного представителя кораллов и у примитивного многоклеточного животного *T. adhaerens*. В результате анализа доменной структуры было показано наличие двух доменов. N-концевой домен содержит два цистеин-богатых повтора, которые демонстрируют сходство с бета-дефенсинами. С-концевой домен рустикалина и его гомологов идентифицирован как член клана Peptidase\_MG. Максимальное сходство наблюдается с ферментом L-аланил-D-глутаматпептидазой, разрезающим пептидогликаны клеточной стенки бактерий. Таким образом, данный tandem доменов, похоже, имеет антибактериальную функцию, защищая Оболочников от бактериальных патогенов.

Интересной особенностью данного белка является происхождение С-концевого домена. Автор наблюдает достоверное сходство данного домена с ферментом, характерным для прокариот.

Степень сходства позволяет предполагать горизонтальный перенос из генома бактерий.

Данный факт подтверждает тенденцию последних лет о том, что горизонтальный перенос – это явление более частое, чем считалось ранее.

В целом, работа производит положительное впечатление. Автором продемонстрированы владение многими методами, умение анализировать литературу, работать с результатами и делать адекватные выводы на их основе. Диссертационная работа Даугавет М. А. несомненно

вносит вклад как в изучение биологии Оболочников, так и в исследование функций белков в целом.

## **Выводы**

Полученные выводы полностью соответствуют целям и задачам работы, а их достоверность не вызывает сомнений.

## **Замечания**

Возможно, стоило бы обсудить тот факт, что мРНК белка туфоксина практически отсутствует в клетках крови, хотя это мажорный белок, который проявляется себя при окрашивании антителами.

Некоторые рисунки имеют слишком короткие описания, а рисунки 15, 18 и 19 составлены из нескольких частей, которые стоило представить в качестве отдельных рисунков.

Все замечания носят рекомендательный характер и не снижают общего положительного впечатления от работы.

## **Заключение**

Диссертационная работа Даугавет М. А. «Белки Оболочников (Tunicata), специфичные для двух типов клеток крови: доменная организация и происхождение», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - «молекулярная биология», является законченным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне.

Основные результаты Даугавет М. А. опубликованы в изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Диссертационная работа Даугавет М. А. полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъяляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Даугавет Мария Аркадьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - «молекулярная биология».

Отзыв на диссертацию и автореферат заслушан и утвержден на заседании межлабораторного семинара по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике института Цитологии и Генетики Сибирского отделения Российской академии наук (10 октября 2022 года, протокол № 06).

## **Данные об организации**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10

Телефон: +7(383) 363-49-80

<http://www.bionet.nsc.ru/>

E-mail: [icg-adm@bionet.nsc.ru](mailto:icg-adm@bionet.nsc.ru)

## **Отзыв составлен**

Ведущим научным сотрудником  
сектора молекулярно-генетических механизмов регенерации  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук»  
кандидатом биологических наук,  
Блиновым Александром Геннадьевичем

15.11.2022

Печать А.Г. Блинова заверено  
ученого супервайзера ИЦиГ СО РАН, к.б.н.  
Орлова Галины Вадимовны

