

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.151.01
(Д 002.230.01), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 17.02.2023 г. №275/453.

О присуждении **Даугавет Марии Аркадьевне** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация **«Белки Оболочников (Tunicata), специфичные для двух типов клеток крови: доменная организация и происхождение»**
по специальности 1.5.3. - "Молекулярная биология"

принята к защите 28 сентября 2022 года (протокол заседания №268/446) диссертационным советом 24.1.151.01 (Д 002.230.01), созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4. Состав Совета утвержден приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012; частичные изм. Совета утверждены Приказом №731/нк от 05.11.2013; частичные изм. Совета утверждены Приказом №155/нк от 09.02.2018; частичные изм. Совета утверждены Приказом №94/нк от 06.02.2019; частичные изм. Совета утверждены Приказом №851/нк от 24.09.2019.

Соискатель **Даугавет Мария Аркадьевна**, «1» декабря 1987 года рождения; в 2011 г. соискатель окончил биолого-почвенный факультет Санкт-Петербургского государственного университета с присуждением

степени магистра биологии.

Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «**Белки Оболочников (Tunicata), специфичные для двух типов клеток крови: доменная организация и происхождение**» защитила в 2023 году в диссертационном совете 24.1.151.01 (Д 002.230.01), созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук. Работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН) с 2013 г., с июня 2013 г. по январь 2020 г. – старший лаборант-исследователь, с января 2020 г. по настоящее время – младший научный сотрудник Лаборатории некодирующей ДНК ИНЦ РАН.

Диссертация выполнена в порядке прохождения очной аспирантуры Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (сроки обучения 01.10.2018 — 30.09.2022).

Диссертация выполнена в Лаборатории некодирующей ДНК Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук.

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор **Подгорная Ольга Игоревна**, главный научный сотрудник Лаборатории некодирующей ДНК Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Столярова Марина Владимировна, доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии и эмбриологии им. проф. А.Г.Кнорре Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Щербаков Дмитрий Юрьевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Лаборатории геносистематики Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральный исследовательский центр **Институт цитологии и генетики** Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, в своем положительном отзыве, **составленном** Блиновым Александром Геннадьевичем, кандидатом биологических наук, ведущим научным сотрудником **Института цитологии и генетики** Сибирского отделения Российской академии наук и **утвержденном** директором Федерального исследовательского центра **Института цитологии и генетики** Сибирского отделения Российской академии наук доктором биологических наук, академиком РАН, Кочетовым Алексеем Владимировичем **указала, что** диссертационная работа Даугавет Марии Аркадьевны является законченным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне и содержит описание двух новых белков асцидий и их гомологов, принадлежащих Оболочникам и другим группам многоклеточных. Диссертация полностью удовлетворяет требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 в действующей редакции), предъявляемым ВАК к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Даугавет Мария Аркадьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

Соискатель имеет 18 опубликованных работ по теме диссертации, из них 5 работ в рецензируемых научных изданиях и 13 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Daugavet MA, Shabelnikov S, Shumeev A, Shaposhnikova T, Adonin LS, Podgornaya O. Features of a novel protein, rusticalin, from the ascidian *Styela rustica* reveal ancestral horizontal gene transfer event. *Mobile DNA*. 2019;10(1):4.

В работе описан новый белок гиалиноцитов, рустикалин, особенности его аминокислотной последовательности и происхождение его гена. Выдвигается гипотеза об участии горизонтального переноса гена бактерии в образовании гена рустикалина. Приводятся данные, показывающие участие бактериофага в качестве возможного посредника горизонтального переноса.

2. Daugavet MA, Shabelnikov S, Podgornaya O. Amino acid sequence associated with bacteriophage recombination site helps to reveal genes potentially acquired through horizontal gene transfer. *BMC Bioinformatics* 21, 305 (2020).

В работе описываются белки многоклеточных организмов, имеющие сходное с рустикалином строение, но не являющиеся его гомологами. Обсуждается возможная роль аминокислотной последовательности цистеин-богатых повторов, как маркера белков, произошедших в результате горизонтального переноса генов бактерий.

3. Daugavet M.A., Dobrynina M.I., Shaposhnikova T.G., Solovyeva A.I., Mittenberg A.G., Shabelnikov S.V., Babkina I., Grinchenko A., Ilyaskina D., Podgornaya O.I. New putative phenoloxidase in ascidian blood cells. *Scientific Reports*.

В работе описан новый белок крови асцидий, туфоксин, который относится к фенолоксидазам альфа подтипа. Прослеживается эволюция фенолоксидаз альфа подтипа, начиная от прокариот, которая сопровождается добавлением новых функциональных доменов в состав белка. В том числе появление домена тромбоспондиновых повторов в последовательности туфоксина является эволюционным приобретением Оболочников.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора кафедры естественнонаучных дисциплин Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный университет» кандидата технических наук **Петрушина Ивана Сергеевича**.

Отзыв положительный, имеются замечания:

«...1. Автор упоминает сходство С-концевого домена рустикалина с пептидазой бактериофага A500. Мне кажется интересным провести сравнение пространственных структур выявленных доменов с гомологами.

2. Предполагается ли в дальнейшем депонирование в международные базы данных последовательностей белков? Поиск в InterPro выдаёт множество результатов по слову “rustica”, но “rusticalin” не упоминается ни разу.

3. В последние годы широкое распространение получили методы таксономической классификации белков без выравнивания на основе k-меров. В частности, для идентификации вирусных белков нами используется программа Kaiju. Возможно, гомологи туфоксина и рустикалина существуют и у других организмов.»

2. Старшего научного сотрудника Лаборатории геносистематики ФГБУН Лимнологического института СО РАН кандидата биологических наук **Букина Юрия Сергеевича**.

Отзыв положительный, имеются замечания:

«...1) В автореферате фигурирует название исследуемого вида как *S. rustica*. При первом упоминании названия вида в задачах работы (страница 4) родовое название не расшифровывается. Впервые родовое название фигурирует в разделе «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ» на странице 6. По правилам зоологической номенклатуры полное название вида из родового и видового названия должно быть приведено при первом упоминании в научной работе. Тоже замечание можно высказать и по другим видам (*S. sanopus*), упоминаемым в автореферате.

2) В разделе «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ» упоминается расшифровка и сборка de novo траскриптома *S. rustica*. Далее в работе нигде не приводится информация о том, были ли мРНК белков туфоксина и рустикалина доминирующими среди продуктов транскрипции. Какова была концентрация матричных (доля или РРKM) мРНК этих белков по сравнению с другими мРНК?

3) В задачах работы говорится о выделении мажорных белков клеток. Следовательно, белки туфоксин и рустикалин являются мажорными компонентами морулярных клеток и клеток гиалиноцитов из крови *S. rustica*, собранных в районе биологической станции Белого моря. Можно ли предположить, что эти же белки будут мажорными компонентами клеток крови *S. rustica*, собранных в других географических локациях и других условиях? Будут ли эти белки доминирующими у других оболочников?»

3. Доцента кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета кандидата биологических наук **Галкиной Светланы Анатольевны**.

Отзыв положительный, имеются замечания:

“...обнаружились неудачные фразы, например «Этот белок является примером химерной последовательности, часть которой имеет эукариотическое происхождение, а часть произошла путём горизонтального переноса гена бактерий» (стр. 4). Также возникают вопросы к использованию слова «гомолог». Имея в виду, что термин «гомология» указывает на общее происхождение, в большинстве случаев его следовало бы употреблять более аккуратно, заменив на «сходство» или «сходные последовательности» (например, на стр. 4, 8, 12, 14, 15). При прочтении автореферата возник и методический вопрос: какие особенности последовательности зондов для ЕЗН влияют на проведение реакции гибридизации при 36°C или 37 °C (стр. 7), с разницей всего в один градус?”

4. Профессора кафедры зоологии беспозвоночных Санкт-Петербургского государственного университета, доктора биологических наук **Слюсарев Георгий Сергеевич**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. д.б.н. Боголюбов Дмитрий Сергеевич, заместитель председателя Диссертационного совета;
2. д.б.н. Мартынова Марина Георгиевна, член Диссертационного совета;
3. д.б.н. Хайтлина Софья Юрьевна, в.н.с., ИНЦ РАН;
4. д.м.н., проф. Шавловский Михаил Михайлович, член

Диссертационного совета;

5. д.б.н., член-корр. РАН Томилин Алексей Николаевич, член Диссертационного совета;

6. д.б.н. Остроумова Ольга Сергеевна, член Диссертационного совета;

7. к.б.н. Анацкая Ольга Владимировна, с.н.с., ИНЦ РАН.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией специалистов в области молекулярной биологии, зоологии и филогении, необходимой для объективной оценки представленных результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны новые представления о механизме горизонтального переноса генов из геномов бактерий в геномы эукариотических организмов;

предложена гипотеза, согласно которой в результате рекомбинации кольцевого генома бактериофага с коротким комплементарным участком генома эукариот образуются химерные последовательности;

доказано присутствие в крови асцидий двух новых белков — туфоксина и рустикалина, один из которых (рустикалин) кодируется геном химерного происхождения;

введены новые представления о механизмах эволюционно значимых преобразований геномов эукариот.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, предполагающие происхождение гена рустикалина путём горизонтального переноса из прокариотического

генома;

применительно к проблематике диссертации эффективно использован комплекс современных молекулярно-биологических и вычислительных методов, таких как полимеразная цепная реакция, клонирование и секвенирование ДНК, масс-спектрометрия белков, лазерная конфокальная микроскопия, филогенетический анализ последовательностей и другие;

изложены результаты экспериментального поиска белков и анализа цитоспецифической экспрессии соответствующих генов;

раскрыты наиболее вероятные молекулярные механизмы образования генов рустикалина и туфоксина;

изучены функциональные особенности аминокислотных последовательностей туфоксина и рустикалина, строение некодирующих участков генома, прилежащих к соответствующим генам;

проведена модернизация методических подходов к описанию и анализу новых белковых последовательностей.

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

представлены результаты, описывающие вероятные антимикробные свойства рустикалина, которые могут быть применены на практике для борьбы с резистентными штаммами бактерий;

определены в молекуле рустикалина: дефенсин-подобный домен, который потенциально способен встраиваться в мембрану бактерий, и пептидазный домен, который потенциально способен разрезать клеточную стенку бактерий, что определяет перспективы использования антимикробных белков, подобных рустикалину, в медицине;

создана теоретическая база для дальнейших разработок антимикробных препаратов на основе белков асцидий.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты получены на сертифицированном оборудовании, выбор методов соответствует поставленным в работе задачам и обоснован спецификой исследований, показана воспроизводимость результатов исследования;

теория (гипотеза) построена на проверяемых данных и согласуется с новыми опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации и по смежным отраслям;

идея базируется на экспериментальных данных, полученных автором, и анализе данных протеомики и молекулярной филогении, представленных в современной литературе;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее при исследовании происхождения и функций новых белковых последовательностей;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по исследованным тематикам, в тех случаях, когда такое сравнение возможно;

использованы современные методы сбора и обработки экспериментальных и теоретических данных, адекватные математические методы обработки результатов.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и проведении экспериментов, анализе и обобщении результатов, апробации результатов и подготовке публикаций.

Диссертация, посвященная характеристике двух новых белков, которые синтезируются в клетках крови асцидии *Styela rustica*, является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей большое значение для понимания

процесса появления в организме белков с новыми функциями. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных М.А.Даугавет 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) по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

В ходе защиты диссертации были высказаны критические замечания и вопросы дискуссионного характера, касающиеся возможности проникновения бактериофагов в клетки эукариот, а так же вероятности конвергентной эволюции белков, выполняющих близкие функции.

Соискатель Даугавет М.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию относительно способов оценки гомологии и аналогии между белками методами молекулярной биологии, биоинформатики и филогении.

На заседании 17.02.2023 г. диссертационный совет принял решение за решение научной задачи, имеющей значение для развития сравнительной молекулярной биологии и эволюционной биологии **присудить Даугавет Марии Аркадьевне** ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология», участвовавших в заседании, из 25 человек,

