

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Марии Аркадьевны Даугавет «Белки Оболочников (Tunicata), специфичные для двух типов клеток крови: доменная организация и происхождение», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»

22 января 2023 г.

**Актуальность** Диссертационная работа Марии Аркадьевны Даугавет посвящена исследованию представителей подтипа Оболочников (Tunicata) - древней группы примитивных животных, у которых признаки хордовых проявляются только на стадии личинки. Они являются сестринской группой по отношению к Позвоночным и, следовательно, помимо самостоятельного интереса, они важны как ближайшая внешняя группа при исследовании эволюции самых разнообразных признаков у хордовых. Естественно, это требует максимально подробного и глубокого изучения эволюции и механизмов функционирования различных систем у Оболочников на всех уровнях начиная с молекулярного. Именно в этом контексте выполнена работа М.А.Даугавет, которая привела к открытию и описанию двух новых белков, обильно экспрессирующихся в кровеносной системе Асцидий – туфоксина и рустикалина.

Внимание к кровеносной системе Оболочников обусловлено тем, что несмотря на подробное описание функций основных клеточных типов в их крови, молекулярные основы, объясняющие эти функции, недостаточно известны. Описание новых молекул, отвечающих за работу клеток крови Хордовых, важно для понимания работы кровеносной системы.

В результате поиска ортологов обнаруженных белков в генбанке и филогенетического анализа получены свидетельства возможной роли горизонтального переноса в появлении рустикалина, что представляет интерес с точки зрения выяснения механизмов этого явления, значение которого в эволюции еще не до конца ясно.

### Структура диссертации

Диссертация М.А. Даугавет имеет стандартную структуру, она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы, содержащего 253 ссылки на первоисточники. Работа изложена на 135 страницах, содержит 21 рисунок, 2 таблицы и приложение на 31 странице.

**Введение** Во Введении Мария Аркадьевна обосновывает проблему, актуальность, описывает степень разработанности темы исследования, формулирует положения, выносимые на защиту, отражает новизну и значимость диссертационной работы. Цель и задачи сформулированы четко. Определен личный вклад автора, степень достоверности и апробация результатов, а также приведены основные публикации автора по теме диссертации.



**Обзор литературы** дает подробную информацию об эволюционной истории Оболочников и их связях с Позвоночными, также содержит достаточно подробный очерк современной таксономии всей группы, включая систематическое положение видов - объектов исследования. Детально описаны клеточные элементы их морфология и функции. Отдельный раздел посвящён обзору структур и функций ферментов фенолоксидазной системы. В подробностях описано строение и состав покровов (туники), в частности - активности приобретённой, скорее всего, путем горизонтального переноса целлюлозосинтазы. И, наконец, рассмотрены многие доказанные случаи горизонтального переноса и обсуждены возможные механизмы этого явления.

**Материалы и Методы** . Сбор и хранение материала для исследования асцидий *Styela rustica* описан подробно, сомнений в адекватности методов хранения, препарирования и фракционирования клеток крови не возникает.

Экспериментальные методы описаны подробно и точно, хотя описания содержат опечатки (например, не указано, был ли забуферен раствор для ресуспендирования клеток и далее на той же странице «0,3 Трис - HCl» буфер для нанесения, стр. 36 диссертации).

Следует отметить очень широкий набор современных экспериментальных методов, использованных М.А. Дауговет. Иллюстрации результатов их применения, приведенные в диссертации, показывают отличное качество выполнения работы и подтверждают достоверность сделанных на основании экспериментов выводов.

Биоинформатические методы описаны достаточно подробно для воспроизведения результатов, однако описание не лишено ряда технических недостатков, в частности осталось неясно:

- зачем использованы различные программы (и алгоритмы) выравнивания аминокислотных последовательностей, сравнивали ли результаты и как, тем более, что затем их фильтровали Gblocks;
- при описании фильтрации данных Gblocks термин «информативные участки» вводит в заблуждение, поскольку в филогенетическом анализе он используется иначе. Думаю, лучше было бы исключать «неоднозначно выровненные» участки («ambiguously aligned» согласно описанию программы)
- почему при филогенетическом анализе разными методами предполагали разные модели молекулярной эволюции? Тем более, что это никак не сказалось на результатах.

Должен заметить, что перечисленные замечания носят редакционный характер и никак не отменяют того, что методический потенциал, применённый автором для решения задач рецензируемой исключительно богат, адекватен и свидетельствует о высокой профессиональной квалификации Марии Аркадьевны.

**Результаты** . Представление результатов структурировано, хорошо иллюстрировано. Глава включает четыре больших раздела, каждый из которых состоит из подразделов, в которых описаны этапы исследования двух белков, которые рассматриваются в диссертации.



Новый белок туфоксин, специфичный для морулярных клеток крови. Фракционирование клеток крови асцидий позволили установить цитоспецифичность туфоксина к морулярным клеткам. Иммунодетекция перекрестно реагирующих с антителами против туфоксина полипептидами позволило выявить более легкий белок 26кДа. Сочетание анализа транскриптомов и масспектрометрии электрофоретически очищенных фракций позволило однозначно идентифицировать туфоксин, определить его структуру (комбинирую результаты, полученные для *S. rustica* и данных, полученных другими авторами для *S. canopus*, *S. plicata* и *S. clava*) и идентифицировать его как тирозиназу, а также обсудить его происхождение. Природа и вероятная роль белка 26кДа осталась не ясной: он вполне может оказаться как самостоятельным белком – результатом, например, альтернативного сплайсинга или промежуточными продуктом деградации булка 48кДа.

Новый белок рустикалин, специфичный для гиалиноцитов крови. При разделении клеток крови была получена фракция, обогащенная гиалиноцитами. В них был идентифицирован белок с молекулярным весом 23 кДа. Сочетание масспектрометрического секвенирования пептидов и транскриптомного анализа позволило определить аминокислотную последовательность этого белка и сделать вполне обоснованные предположения о его функции как антибактериального. Особенно интересные результаты дал анализ этой последовательности и возможных путей её происхождения.

**Обсуждение** Подробное и интересное обсуждение разбито на две части соответственно исследованным в работе белкам. Обсуждаются гипотезы их происхождения, структурные и (потенциально) функциональные сходства и различия с другими членами соответствующих семейств и суперсемейств белков. В случае туфоксина, наиболее интересна часть о его возможной физиологической роли.

Самой интересной особенностью рустикалина оказалось его происхождение в результате древнего и, вероятно, опосредованного фагом горизонтального переноса, сопровождавшегося внедрением интронов в кодирующий его ген. Убедительными представляются приведенные в «Обсуждении» свидетельства того, что возникновение рустикалина у Оболочников было частью многоступенчатой и сложной сети горизонтального распространения генов, кодирующих сходные структурно и/или функционально белки.

**Выводы** Выводы сформулированы ясно и полно, они соответствуют целям и задачам.

**Автореферат** . Текст автореферата соответствует содержанию диссертационной работы. По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах из перечня ВАК, а также тезисов сообщений по теме работы, которые были представлены на пяти международных и восьми российских конференциях.

### **Замечания и пожелания**

1. Мне представляется не верным употребление термина «гомология» во многих местах диссертации вместо гораздо менее обязывающего термина «сходство». Гомология по определению предполагает общность происхождения, и

уже во вторую очередь – подобие структуры и возможно – функции. Используемые в работе биоинформационные методы сравнения последовательностей оценивают именно их сходство и вероятность того, что оно не случайно. В филогенетическом анализ используется предположение о гомологии. Поэтому я бы рекомендовал при описании сходных последовательностей говорить об ортологах, как это широко распространено в настоящее время

2. В работе отсутствуют и не упоминаются данные об экспрессии туфоксина и рустикалина в онтогенезе, что было бы очень интересно с учетом их эволюционной связи с Позвоночными и морфологического сходства с последними на личиночной стадии.

Последнее замечание является скорее пожеланием. В целом высказанные замечания носят в основном редакционный характер и не умаляют научного значения представленной работы.

## Заключение

Таким образом, из вышесказанного можно сделать вывод о том, что диссертационная работа Марии Аркадьевны Даугавет «Белки Оболочников (Tunicata), специфичные для двух типов клеток крови: доменная организация и происхождение», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным исследованием, которое выполнено на высоком научном и методическом уровне. По актуальности, новизне, степени обоснованности научных положений и выводов, а также по степени опубликованности основных результатов, эта диссертационная работа полностью отвечает всем требованиям пп. 9 – 11, 13 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции от 11.09.2021 г.), а ее автор, Мария Аркадьевна Даугавет, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

д.б.н., заведующий лабораторией геносистематики  
Лимнологического института СО РАН,  
664033 Иркутск, ул. Улан-Баторская 3,  
тел. (3952) 42-29-23,  
Электронная почта: sherb@lin.irk.ru

 Д.Ю.Щербаков

Подпись заведующего лабораторией, д.б.н. Щербакова Д.Ю. ЗАВЕРЯЮ.  
Ученый секретарь ЛИИ СО РАН к.б.н. Максимова Н.В.

