

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Николаевой Ольги Владимировны
на тему: «Дивергентные митогеномы беспозвоночных животных»
по специальности 03.01.09 – “Математическая биология,
биоинформатика”

Диссертационная работа Ольги Владимировны Николаевой посвящена «сравнительно-анатомической» организации митогеномов и филогенетическому анализу Киноринх, Волосатиков, Ортонектид и Дицемиид. Киноринхи и Волосатики относятся к группе Ecdysozoa, или Линяющих животных, к которым также относятся хорошо известные таксоны, как Членистоногие и Круглые черви. Но несмотря на широкую известность, реконструкция филогенетических отношений таксонов Линяющих животных пока не закончена и сопряжена с многими сложностями. Ортонектиды и Дицемииды долгое время считались близкими группами, составляющие один тип Мезозои, и ученые их сравнивали с личинками кораллов и медуз. Однако молекулярные методы не поддерживают объединение этих таксонов, однако в литературе отсутствуют достоверные результаты, предполагающие возможные сестринские группы Ортонектид и Дицемиид. В целом, все четыре исследуемые группы беспозвоночных животных очень необычны по строению, труднодоступны, а их филогенетическое положение вызывает оживленные дебаты. Все это делает диссертационную работу Ольги Владимировны очень важной и актуальной.

Диссертация состоит из введения, списка условных сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Всего работа изложена на 151 странице, содержит 32 рисунка и 23 таблицы. Список литературы включает 456 источников, опубликованных в период с 1876 по 2021 гг. На русском языке 9 источников.

В введении, изложенном на пяти страницах, ясно представлена актуальность исследования и из него логично вытекают поставленные цели и задачи исследования, а также обоснован выбор объектов и методов исследования. Во введении указана научная новизна, теоретическая и практическая ценности исследования, а также основные положения, выносимые на защиту. Несмотря на лаконичность изложения, эта глава самая популярная по числу грамматических ошибок, сконцентрированных на странице 6, что при прочтении диссертации создает первичное ложно плохое впечатление от текста.

Обзор литературы, изложенный на 22 страницах, включает подробное описание особенностей организации митогеномов животных и используемые подходы для филогенетических реконструкций на основании митогеномов, а также описание и таксономические положение исследуемых групп беспозвоночных животных. Зоологическое введение в изученные группы полные, что определяет Ольгу Владимировну как редкого биоинформатика, знающего биологию своего объекта исследования. Единственное замечание к этому разделу состоит в том, что отсутствует самая свежая работа Ховарда с соавторами, вышедшая в январе 2022 года, посвященная палеонтологии и филогеномике Линяющих животных. В числе результатов Ховард с соавторами показали монофилию Скалидофора с высокой поддержкой, а Лорициферы являются сестринской группой по отношению к Приапулидам и Киноринхам. Соответственно, эти результаты и методы исследования никак не обсуждаются в диссертации. В связи с этим, мой первый вопрос, как Вы, Ольга Владимировна, сопоставите результаты своего митогеномного анализа с результатами филогеномного анализа Ховарда с соавторами, использующего в своем анализе 228 белок-кодирующих генов?

Глава «Материалы и методы» занимает на 11 страниц и включает детальное описание сбора животных, выделения ДНК, способы секвенирования, сборки, аннотации, анализов организации митогеномов, филогенетических анализов, анализ синапоморфий. Глава полная, однако не

указано, как произведено снятие кутикулы волосатиков и в чем зафиксированы их ткани для выделения ДНК. Процедура снятия кутикулы волосатиков – нетривиальная проблема, так как толщина тела волосатиков всего несколько миллиметров, поперечное сечение округлое, а тело у них из-за кутикулы очень жесткое.

Результаты и их обсуждение объединены в одну главу и занимают 68 страниц. Эта глава разделена на два крупных блока, один посвящен исследованию морфологической структуры митогеномов у двух видов Киноринх, четырех видов Волосатиков, одного вида Орtoneктид и одного вида Дицемиид. Второй блок посвящен практическому применению митогеномов в определении филогенетических взаимоотношений изученных групп. Некоторые результаты написаны в соавторстве с коллегами, например, глава про палиндромные последовательности написана в соавторстве с Ю.В. Панчиным и Б.Д. Ефейкиным, каждый специалистами в своей области. Подобные комплементарные взаимодействия позволяют повысить эффективность исследований и достоверность результатов, а также показывают, что диссертант способен на сотрудничество и работу в коллективе.

Первый блок результатов представляет собой описание организации митогеномов, включает ясные диаграммы и таблицы состава митогеномов (включая белок-кодирующие гены, гены тРНК, гены рРНК), наглядные сравнительные схемы последовательностей консервативных блоков митохондриальных генов. В этой части результатов предсказан порядок генов в митогеномах общего предка Киноринх, Волосатиков и Орtoneктид, показан нуклеотидный состав, оценено общее низкое процентное содержание GC, выявлены неcodирующие регионы. Здесь короткий вопрос, с чем может быть связано повышенное содержание AT в митогеномах исследованных животных? Однако в представлении этой части результатов наблюдается некоторая неоднородность. Например, для исследованных киноринх и орtoneктиды представлена краткая сводка митогенов, на странице 45 и 73,

соответственно, однако такая сводка отсутствует для волосатиков и дицемииды. Кроме того, в случае дицемииды отсутствуют таблицы по организации митогенома и данные по нуклеотидному составу. С чем связана такая неоднородность представленных результатов?

Митогеномы каждой из исследованных групп обладают своими особенностями. Радует, что для каждой из особенностей диссертант подбирает и применяет индивидуальные решения для изучения этих особенностей. Например, наличие инвертированных повторов в митохондриальных генах Волосатиков. Автор диссертации помимо стандартных биоинформатических методов проводит элегантные эксперименты по доказательству наличия этих инвертированных повторов и по исследованию способности инвертированных повторов образовывать шпильки и влиять на репликацию митохондриальной ДНК у волосатика *Gordionus alpestris*. Дополнительно проведено секвенирование транскриптома для сравнения кДНК с геномными последовательностями. Все эти эксперименты проиллюстрированы понятными схемами, показывающими суть экспериментов, что позволяет неспециалистам разобраться в них.

Отдельно исследована организация дублицированных генов метиониновых тРНК (*trnM1* и *trnM2*) у Киноринх - наличие которых редкая особенность митогеномов многоклеточных животных. Интересно, что ближайшие родственники приапулиды имеют один ген метиониновых тРНК *trnM*. Анализ проведен полно, предсказана вторичная структура и проведен филогенетический анализ генов тРНК Киноринх. Проведен сравнительный анализ дублицированных генов тРНК в митогеномах у многих беспозвоночных животных, показано, что мутации и ремолдинг генов следуют за их дубликацией, далее могут формироваться псевдогены, которые впоследствии могут претерпевать делеции. Можно ли использовать состояние этих тРНК в качестве критерия, определяющего эволюционный возраст группы? Если да, то возраст группы какого таксономического ранга:

типа, класса, отряда, семейства, рода или вида?

Выявлена необычная особенность митогенома дицемииды, заключающаяся в наличии всего 11 тРНК (причем 4 из них не имеют одной из петель), тогда как у всех других исследованных групп животных 22 тРНК, кроме того гены располагаются на 21 миникольцах. С чем связаны такие необычные особенности организации митогенома этой дицемииды?

Недавно в мировой сообществе было высказано революционное предположение, что Орtoneктиды – это миниатюризированные несегментированные и нецеломические кольчатые черви, которые сохранили аннелидную кутикулу, дорзальный мозг и сериальность расположения кольцевых мышц и ресничных клеток. И хотя в диссертации однозначно не написано и не вынесено, как защищаемое положение, но Ольга Владимировна впервые показала точное филогенетическое положение Орtoneктид на древе Аннелид. Благодаря использованию модели сайт-специфических замен (САТ) при построении филогенетических деревьев по митохондриальным данным, а также на основании синапоморфий порядка генов и аминокислот диссертант впервые показала родство Орtoneктид с кладой, включающей Лобатоцеребриид и Сипанкулид. Такое сближение представляется мне очень логичным с точки зрения анатомии этих животных.

Лобатоцеребрииды и Сипанкулиды – необычные несегментированные аннелиды, долгое время их филогенетическое положение вызывало многочисленные дискуссии. Только на основании молекулярных исследований эти группы были признаны аннелидами. Сипанкулиды были признаны в 1997 году (МакХью, 1997), и Лобатоцеребрииды объединены с Сипанкулидами в 2015 году (Лаумер и др., 2015). По сравнению с этими двумя группами Орtoneктиды еще более просто организованы, поэтому неудивительно что их филогенетическое положение долго оставалось неопределенным. Я провела небольшой анализ опубликованных данных по строению Орtoneктид, и оказалось, что они, действительно, имеют много

общих черт с Лобатоцереридами. Можно выделить следующие общие морфологические признаки: отсутствие сегментов тела, параподий и щетинок, наличие ресничных покровов, отсутствие кровеносной системы, отсутствие целомической полости, наличие двулопастного дорзального ганглия, наличие и передних роstralных нервов (которые крайне редки среди аннелид), организация и равное развитие продольной и кольцевой мускулатуры. К морфологическим различиям можно отнести: наличие почек и вентрального нервного ствола у Лобатоцеребриид, а также большее число мышечных пучков у Лобатоцеребриид. Однако эти различия можно объяснить большими размерами Лобатоцеребриид, которые достигают 1-3 мм в длину, тогда как самка ортонектиды Интошия не более 100 микрон.

В целом у кольцецов преобладает развитие продольной мускулатуры. Однако у роющих видов аннелид кольцевая мускулатуры развита заметно лучше. Поэтому можно выдвинуть гипотезу, что равное развитие кольцевой и продольной мускулатуры Ортонектид и Лобатоцеребриид унаследована от общего роющего аннелидного предка.

Наличие у Ортонектид полового диморфизма и карликовых самцов, размеры их тела, ресничные покровы и отсутствие сегментации, а также необычное положение продольных мышц снаружи относительно кольцевых мышц, которое описано у личинок типичных аннелид филлодицид, сферодорид, нериллид, магелонид и зибоглинид, говорит в пользу о прогенетическом происхождения Ортонектид, то есть об ускоренном развитии половой системы на личиночной стадии аннелидного предка.

В целом, этот научный результат, полученный в работе Ольги Владимировны, является прорывным в зоологии и филогенетике и должен быть незамедлительно опубликован.

В работе реконструированы предположительные порядки генов для Первичноротых и Линяющих, а также возможные сценарии эволюции порядка генов в соответствии с гипотезой о консервативных блоках генов в митогеномах Билатерий. Подобные умозаключения интересны и полезны в

научном плане, однако диссертант проводит эту реконструкцию на примере филогенетического анализа, ссылки на который не приведены в диссертации. Схема на Рис. 14 показывает, что Линяющие животные включают себя группу Панартропод, которые объединяют Приапулид, Волосатиков и Киноринх (что показано серыми жирными стрелками). Почему выбраны именно такие взаимоотношения внутри Линяющих животных? Было бы логичнее использовать конкретное филогенетическое дерево, например, один из недавних филогеномных анализов Ховарда и др., 2022, или результаты молекулярно-филогенетического анализа Жирибета и Эйджкомба, опубликованного 2017 года, в котором Панартроподы являются сестринской группой ко всем остальным Линяющим животным. Это позволило бы сделать предсказание порядка генов в митогеномах Линяющих и Билатерий более аргументированным.

Многостороннее исследование каждого научного результата привело к выявлению новых закономерностей. Например, выявлены возможные артефакты секвенирования кДНК: чем больше %GC в нуклеотидной последовательности данного гена, тем больше на него приходится ридов RNA-seq. В связи с этим вопрос, может ли диссертант предложить способы исправления этого артефакта секвенирования?

В целом, новизна, заключающаяся в новой совокупности методов и объектов исследования, не оставляет сомнения, совокупность методов и объектов новы. Глубокий и многосторонний анализ каждого результата достоверно подтверждены. Основные положения, выдвигаемые на защиту обоснованы.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.09 – “Математическая биология, биоинформатика” (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5

приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Николаева Ольга Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – “Математическая биология, биоинформатика”.

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Римская-Корсакова Надежда Николаевна

14 июня 2022 года

Контактные данные:

тел.: 7(495) 939 5695, e-mail: nadezdarkorsakova@gmail.com

Специальность 03.02.04 - зоология

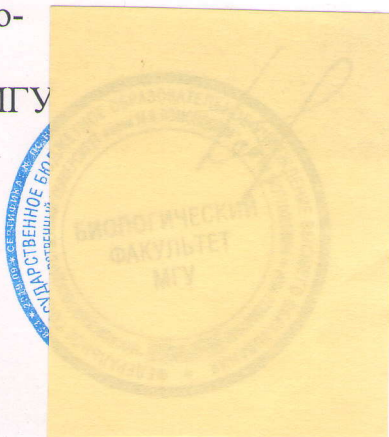
Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ, Кафедра зоологии беспозвоночных,

Тел.: +7 495 939 5695; e-mail: NadezdaRKorsakova@gmail.com

Подпись Римской-Корсаковой Н.Н. удостоверяю

Ученый секретарь, зав. научно-
организационным отделом
Биологического факультета МГУ



Е.В. Петрова

«14» июня 2022 г.