

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Паньковой Марины Владимировны «**Структура и эволюция генов гормона роста лососевых рыб (Salmonidae)**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.02.07** – генетика.

Диссертационная работа Марины Владимировны Паньковой посвящена сравнению структуры и дивергенции двух генов-паралогов гормона роста, у гольцов рода *Salvelinus*. Актуальность выбранной темы не вызывает сомнения, поскольку дубликации являются одним из наиболее значимых механизмов эволюционного преобразования геномов. Генные дубликации и их последствия играют важную роль в эволюции новых функций гена. Накоплены обширные знания о дубликации генов на филогенетическом, функциональном и геномном уровнях, показана их связь с некоторыми болезнями или адаптивными преимуществами и т.п. Однако понимание селективных и эволюционных механизмов, участвующих в возникновении, поддержании и эволюции генных дубликаций остается весьма приближенным и фрагментарным. Некоторые примеры генных дубликаций, такие как гены гормона роста, продукты экспрессии которых участвуют в многочисленных физиологических процессах, привлекают особое внимание в связи с возможными перспективами их использования в генной инженерии и создании трансгенных животных.

В работе Марины Владимировны Паньковой впервые изучены полные нуклеотидные последовательности двух генов гормона роста, *gh1* и *gh2*, у четырех видов гольцов рода *Salvelinus* - *S. curilus*, *S. malma*, *S. taranetzi* и *S. levanidovi*. На основе собственных и привлеченных из генного банка нуклеотидных последовательностей проведен сравнительный анализ дивергенции интронных и экзонных последовательностей генов гормона роста лососевых рыб, реконструированы филогенетические связи. Проведены тесты на отбор, что является несомненным достоинством работы.

Рукопись диссертации М.В. Паньковой имеет традиционную структуру и состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), выводов и списка цитируемой литературы, включающей ссылки на 174 публикации, в том числе 167 – зарубежных авторов. Диссертация изложена на 140

страницах компьютерного текста, включая две страницы приложения, иллюстрирована 32 таблицами и 20 рисунками. Замечаний по оформлению и структуре диссертации нет.

Во **«Введении»** диссертации обосновывается актуальность проблемы, степень ее разработанности, формулируется цель исследования, в соответствии с которой ставятся задачи, решаемые в ходе проведенной исследовательской работы, а также положения, выносимые на защиту.

Вопрос: «Полученные результаты используются...для создания полноразмерной генетической конструкции гормона роста...» (стр. 6). Гормона роста, или его гена?

В **Главе 1**, «Обзор литературы», автор приводит большой объем опубликованного в современной научной литературе материала по истории изучения гормона роста (раздел 1.1), результатам изучения гормона роста и генов гормона роста человека (раздел 1.2 и 1.3) и позвоночных, включая лососевых рыб (раздел 1.4 и 1.5), а также эволюции генов гормона роста позвоночных (раздел 1.6). Следует отметить, что обзор литературы написан достаточно подробно, с результирующим абзацем в конце каждого раздела, и позволяет получить необходимые сведения об экзон-интронной структуре и эволюции генов гормона роста позвоночных. Единственное замечание по содержанию касается псевдогенов гормона роста лососевых (стр. 31-32). Автором даны только две ссылки, причем на работы более чем двадцатилетней давности, хотя такие исследования продолжаются. Для облегчения восприятия приводимой информации, подробное описание структуры генов гормона роста для разных видов позвоночных желательно проиллюстрировать.

Другие замечания:

1. 33 нуклеотидный повтор неверно назван микросателлитной ДНК (стр. 27), это минисателлитная ДНК. Микросателлитная ДНК состоит из tandemно повторяющихся мономеров длиной не больше 9 пар оснований.
2. Правильно ли сформулирована мысль: "Большинство дубликаций гена сохраняются субфункционализацией" (стр. 36)? Большинство дубликаций, как известно, подвергаются псевдогенезации. Субфункционализация обнаружена у большинства из сохранившихся дубликаций гена.
3. «...выше по течению от гена GH-N» (стр. 15), «...ниже по течению...» (стр. 17). Применительно к ДНК, «upstream» и «downstream» переводится, как слева (выше) и справа (ниже) от конкретного участка (гена).

В **Главе 2** «Материалы и методы» описаны исследуемые в работе образцы гольцов. Дан список последовательностей полноразмерных генов гормона роста и интронных (С и

D) последовательностей других видов лососевых из базы генного банка NCBI. Все описанные методы, включая статистические, применявшиеся в работе для анализа и обработки экспериментальных данных, широко используются в молекулярной генетике и соответствуют поставленным задачам.

По данной главе есть несколько мелких замечаний:

1. Описание гидролиза ПЦР продуктов рестриктазами необоснованно включено в подраздел «Аmplификация ДНК»;
2. Амплификацией ДНК также является молекулярное клонирование – следующий подраздел; подраздел «Аmplификация ДНК» лучше было бы назвать «ПЦР амплификация ДНК»;
3. Строго говоря, рисунок 2.1 (стр. 42) нельзя называть рестрикционной картой. Даны две схемы локализации сайтов рестрикции для двух рестриктаз. Рестрикционная карта - схема, изображающая взаимное расположение сайтов рестрикции для разных рестриктаз с указанием расстояния между ними.
4. Здесь и по всему тексту мутации называются то нуклеотидными/аминокислотными «замещениями», то «заменами» (что предпочтительней). Желательно единообразие, как и для других терминов (например, «цАМФ-ответные элементы» - стр. 32 и «цАМФ-ответственный элемент» - стр. 107, хотя оба варианта нельзя назвать удачными).

В **Главе 3** «Результаты» представлен анализ экспериментального материала, полученного автором в ходе проделанной работы. Диссертантом впервые получены и проанализированы полные нуклеотидные последовательности двух генов гормона роста для четырех видов азиатских гольцов. Глава состоит из трех разделов.

**Раздел 3.1** посвящен изучению структуры генов гормона роста. В подразделе 3.1.1 дана характеристика кодирующих последовательностей - экзонов, и показано, что размер каждого из шести экзонов идентичен для обоих генов и всех видов гольцов. В генах gh1 и gh2 (3666-3675 и 3299-3305 п.н. длиной соответственно) закодировано 210 аминокислот. Структура генов совпадает у исследованных видов и включает шесть экзонов и пять интронов. Всего между генами гормона роста гольцов выявлено 34 нуклеотидных, между белками - 8 аминокислотных замен. Виды лососевых рыб отличаются по 23 аминокислотным заменам, причем по трем аминокислотным заменам отличается сигнальный пептид двух генов. В целом прогнозируемый аминокислотный состав генов гормона роста у гольцов и других лососевых рыб очень сходен; наиболее часто встречается лизин, серин и аспаргин. Лидерная последовательность gh1 одинакова у всех гольцов и других лососевых, а gh2 –отличается по длине. В генах гормона роста найдено

пять кодонов для цистеина, положение которых идентично в генах паралогах у всех видов лососевых рыб. У гольцов gh2 более изменчив, чем gh1. Самые высокие различия между гормонами роста и их генами обнаружены у видов тихоокеанских лососей, а самые низкие – у гольцов. Нуклеотидный состав генов гормона роста практически не отличается у всех видов лососевых рыб. Для кодирующих последовательностей двух паралогичных генов обнаружены отличия по частотам использования кодонов; некоторые триплеты используются только gr1, другие – gr2. Здесь была бы уместной статистическая оценка достоверности наблюдаемых отличий между генами gh1 и gh2 по использованию кодонов.

В подразделе 3.1.2 дана характеристика некодирующих последовательностей – интронов генов гормона роста. Выявлены межвидовая и межгенная вариации в длине интронов, причем наиболее изменчивым оказался пятый интрон. Обнаружены 6-, 9- и 11-нуклеотидные делеции в gh1. В гене gh2 кунджи обнаружена большая делеция (167 пн), также присутствующая у видов других родов лососей. Нуклеотидный состав последовательностей практически не отличался у разных видов. В интронах генов гормона роста обнаружены специфические участки связывания с транскрипционными факторами, выявленные ранее у других лососевых: CRE, ERE, Pit-1. Дана локализация этих элементов, описаны структурные особенности.

Общее замечание/пожелание к разделу 3.1. Весьма полезной могла быть таблица типов нуклеотидных замен для интронов и экзонов, а также график распределения нуклеотидного разнообразия вдоль полноразмерных генов (методом «скользящего окна»).

**Раздел 3.2** посвящен изучению дивергенции кодирующих и некодирующих последовательностей генов гормона роста гольцов и других видов лососевых рыб. В подразделе 3.2.1. дается анализ дивергенции экзонов в генах-паралогах гормона роста гольцов и других видов лососевых рыб. Длина исследуемой последовательности составила 639 п.н. Показано, что дивергенция между генами выше, чем внутри них, а различия между последовательностями у gh2 выше, чем у gh1. Филогенетические деревья свидетельствуют о раздельной эволюции генов гормона роста. Филогенетические деревья, основанные на предсказанных аминокислотных последовательностях, в целом соответствуют аналогичным реконструкциям для экзонов, но имеют слабую статистическую поддержку в узлах ветвления. Результаты ряда тестов показали, что гены гормона роста лососевых рыб находятся под воздействием очищающего отбора, особенно строгого у гольцов.

Замечания:

1. Топология NJ дерева имеет принципиальные отличия от таковых для ML и BI реконструкций, поэтому их нельзя называть одинаковыми (стр. 69).
2. *S. salar* формирует отдельную ветвь (стр. 69), которая неверно названа субкластером; в кластере/субкластере должно быть не менее двух таксонов.
3. Неконгруэнтность/конгруэнтность филогенетических реконструкций (здесь и далее) должна быть подтверждена соответствующим тестом (например, SH), тем более, что этот результат входит в один из основных выводов.

В подразделе 3.2.2. дается анализ дивергенции интронов генов гормона роста гольцов и других видов лососевых рыб. Длина исследуемой последовательности составила 3612 п.н. Средняя величина различий между интронами паралогичных генов в два раза выше, чем между экзонами. Филогенетические деревья, построенные разными методами, в целом имели сходную топологию; во всех случаях топология субкластеров для gh1 и gh2 не совпадала.

**Раздел 3.3** посвящен изучению дивергенции двух интронных последовательностей генов гормона роста лососевых, С и D. В подразделе 3.3.1 анализируется дивергенция интронов С и D у гольцов рода *Salvelinus*. Для восьми видов гольцов рассчитаны попарные генетические дистанции и сконструированы филогенетические деревья. Для гена gh1 длина исследованной последовательности составила 1789 п.н. Филогенетические деревья имели низкие статистические поддержки и неразрешенность общей топологии. Достоверной является только одна клада, объединяющая гольцов азиатского побережья и кунджу; другие рассуждения необоснованны. Для gh2 длина исследованной последовательности составила 1811 п.н. Межвидовая дивергенция этих последовательностей выше, и филогенетические реконструкции более надежные, хотя у них иная топология, чем для gh1. Топология филогенетического дерева по объединенным данным почти не отличалась от полученной для интронов gh2 и надежно объединяла шесть из восьми видов гольцов в одну кладу. В основании древа локализованы кунджа и американский голец.

В подразделе 3.3.2 дан анализ дивергенции интронов С и D паралогичных генов гормона роста лососевых рыб. Филогенетические деревья, построенные разными методами имели сходную топологию с высокой статистической поддержкой отдельных кластеров и подкластеров хотя положение некоторых видов по разным генам отличалось, особенно тайменя и арктического гольца. Подобно экзонам, интронные участки формировали два отдельных кластера, соответствующим двум генам-паралогам. Внутри

каждого кластера выделялись три подкластера, соответственно объединяющие виды *Salvelinus*, *Oncorhynchus* и *Salmo*.

В главе 4 дано обсуждение полученных результатов в сравнении с литературными данными. Приводятся аргументы в пользу функциональности обоих генов гормона роста, обсуждается уровень совпадений между генными и видовыми деревьями, обосновывается предположение о разных скоростях эволюции генов гормона роста в разных таксономических группах. Для объяснения консервативности и различий в скоростях дивергенции интронных последовательностей привлекаются эффекты хичхайкинга и Хилла-Робертсона.

Замечания:

1. Сайты сплайсинга GU/AG являются консервативными, а не консенсусными (стр. 93). У высших эукариот почти все природные интроны имеют динуклеотид GU на 5' конце и AG – на 3' конце (в составе консенсусных последовательностей).
2. Недостает обсуждения судьбы дублицированных генов; заключительный абзац раздела 4.1 дает ссылку на важную, но единственную работу (Ohno, 1970). В свете имеющихся данных о дублицированных генах интерпретация полученных результатов по генам гормона роста могла быть более содержательной. Возможно, было бы понятней «... почему и для чего существуют паралогичные гены в геноме лососевых рыб» (стр. 99) и насколько независима их эволюция (стр. 100).
3. «...при сравнении дивергенции в генах-паралогах видно, что высокая консервативность экзонных участков в гене GH1 определяет и большую консервативность интронных участков в этом гене...» (стр. 113). Что определяет консервативность, из этих данных не может быть видно. Можно говорить о корреляции, но это не обязательно будет означать взаимозависимость.
4. «...первой области гена...», «...второй области гена...» (стр. 106), как понимать?

Выводы диссертационной работы М.В. Паньковой соответствуют ее содержанию. Положения, выносимые на защиту, вполне обоснованы. Тема диссертации соответствует научной специальности. Автореферат отражает содержание диссертации. Основные научные результаты диссертации соискателя опубликованы в виде 3-х статей в научных изданиях, внесенных в Перечень журналов и изданий, утвержденных Высшей аттестационной комиссией, и материалах конференций различного уровня.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценивая работу в целом, следует признать, что это самостоятельное законченное научное исследование, выполненное на современном научном уровне. По научно-практической значимости диссертационная работа Марины Владимировны Паньковой «Структура и эволюция генов гормона роста лососевых рыб (Salmonidae)» соответствует квалификационным критериям (пункт 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а сама М.В. Панькова заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Главный научный сотрудник лаборатории паразитологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Биолого-почвенный институт  
Дальневосточного отделения Российской академии наук (БПИ ДВО РАН)  
Доктор биологических наук, профессор

 Галина Николаевна Челомина

690069 г. Владивосток, Проспект 100-летия Владивостоку, 159  
БПИ ДВО РАН  
e-mail: [chelomina@ibss.dvo.ru](mailto:chelomina@ibss.dvo.ru)

Подпись Г.Н. Челоминой заверяю

Ученый секретарь БПИ ДВО РАН

Кандидат биологических наук

11 мая 2016 г.



О.Г. Корень