

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию ТИШАКОВОЙ Екатерины Валерьевны
«ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ
ИГУАНООБРАЗНЫХ И ГЕККОНООБРАЗНЫХ», представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.7. Генетика

Диссертационная работа ТИШАКОВОЙ Екатерины Валерьевны посвящена одному из актуальных вопросов в современной генетике – исследованию происхождения и эволюции половых хромосом у позвоночных животных. Определение пола у различных групп организмов может варьировать и контролироваться как средовыми (например, температурой окружающей среды), так и генетическим факторами (необходимо наличие геномных локусов, определяющих пол). У большинства позвоночных животных пол определяется посредством половых хромосом, однако до сих пор существует дискуссия о гипотезах формирования половых хромосом, а также остаются не до конца понятны эволюционные механизмы, которые в некоторых случаях способствуют преобразованию аутосом в половые хромосомы.

Объектами диссертационного исследования К.В. Тишаковой являются четыре вида рептилий из инфраотрядов игуанообразные и гекконообразные, которые уникальны и удобны тем, что являются одними из самых многочисленных таксонов среди чешуйчатых и при этом характеризуются удивительным разнообразием систем определения пола. В отличие от теплокровных животных со стабильными половыми хромосомами, у пойкилотермных позвоночных – рептилий, амфибий и рыб – наблюдается удивительное разнообразие систем определения пола: крупные семейства включают виды как со средовым, так и/или генетическим механизмом определения пола, и, в том числе, с разными половыми системами. Эти параметры создают целый ряд преимуществ в изучении различных аспектов эволюции половых хромосом у пойкилотермных позвоночных, в частности у рептилий.

Отличительной особенностью работы автора является использование целого комплекса современных молекулярно-цитогенетических и биоинформатических подходов и методов исследования, а совокупность полученных результатов позволяет выявить общую картину закономерностей эволюции половых хромосом у рептилий.

Основная часть работы К.В. Тишаковой посвящена выявлению и изучению синтенных групп, вовлеченных в формирование половых хромосом у выбранных модельных видов. В основе этих экспериментов лежит секвенирование ДНК-библиотек, специфичных для отдельных хромосом и дальнейшее трудоемкое и времязатратное выравнивание полученных последовательностей на геномы референсных видов. Для оценки степени обогащения вырождающихся гомологов tandemными повторами автором была отсеквенирована геномная ДНК исследуемых видов, из полученных прочтений выделены наиболее распространенные в геномах последовательности сателлитной ДНК, которые затем были локализованы на метафазных хромосомах.

Также **значимой частью** работы является биоинформатический поиск и физическое картирование последовательностей сателлитной ДНК (сатДНК) с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на хромосомах модельных видов. Этот анализ выявил распределение наиболее представленных в геноме повторяющихся сателлитных последовательностей в кариотипах трех исследуемых видов рептилий (*S. malachiticus*, *C. calyptratus* и *C. mitratus*). При этом, большинство последовательностей сатДНК показали тенденцию к кластеризации в определенных хромосомных районах. Интересным оказалось то, что для гетерохроматиновых районов вырождающихся половых хромосом заборной игуаны (*S. malachiticus*) и центральноамериканского геккона (*C. mitratus*) характерна сложная организация сателлитной ДНК, при этом большинство обнаруженных последовательностей сатДНК не являлись специфичными для половых хромосом и могут входить в состав аутосом.

Еще одной важной особенностью исследования К.В. Тишаковой является то, что автор использует два этапа обработки и анализа данных: *лабораторные эксперименты* и *биоинформатический анализ* полученных геномных данных. Во всех этих кропотливых и времязатратных работах К.В. Тишакова принимала непосредственное участие, а лабораторные эксперименты полностью выполнены автором.

Новизна работы проявляется в детальном исследовании генетического состава половых хромосом четырех видов рептилий, а также в определении синтенных групп генов, вовлеченных в формирование половых хромосом у этих же видов. Выявленные автором синтенные группы часто встречаются в составе половых хромосом у многих видов чешуйчатых, что свидетельствует о конвергентном использовании одних и тех же групп сцепления в эволюции их половых хромосом.

Очень важным результатом является то, что впервые у одного из модельных видов определена предполагаемая пара гомоморфных половых хромосом, а у трех видов впервые выявлены последовательности наиболее распространенной сателлитной ДНК, определена их хромосомная локализация, и идентифицированы повторы, которые являются специфичными для половых хромосом.

Всё это определяет **актуальность темы диссертации** и согласуется с поставленной перед исследованием целью - выявить закономерности эволюции половых хромосом у игуанообразных и гекконообразных с помощью комплексного использования молекулярно-цитогенетических и биоинформатических подходов.

Для достижения цели были сформулированы 4 основные задачи, решение которых освещено в главах Результаты, Обсуждение и Заключение. Текст диссертации состоит из 5 глав, а также разделов Список используемых сокращений, Введение, Выводы, Список литературы (190 источников) и трех Приложений.

Содержание и формат диссертации. Рукопись выполнена в классическом формате и изложена на 123 стандартных страницах, включая основной текст с 13 рисунками и 6 таблицами и Приложение с 3 рисунками и 5 таблицами.

Стоит особо отметить, что каждая глава содержит довольно подробную рубрикацию на подпункты, что очень облегчает восприятие материала, а обычно в конце разделов и главы присутствует обобщение и заключение.

В Главе 1 изложен подробный обзор литературы по изучаемой проблеме, в частности освещены такие вопросы как разнообразие систем определения пола, состав половых хромосом и многообразие генов, определяющих пол. Уделено внимание деградации половых хромосом, а также подробно изложены методы идентификации и исследования половых хромосом у позвоночных животных. В отдельный подраздел вынесено описание состояния дел в цитогенетических и геномных исследованиях рептилий, а также дана характеристика инфраотрядов игуанообразных и гекконообразных. Общий объем раздела составляет 23 страницы, в заключительном подразделе 1.7 указывается, что изучение «генетического состава половых хромосом игуанообразных и гекконообразных с помощью сочетания цитогенетических и биоинформатических подходов позволит дополнить наши знания о том, как происходит эволюция половых хромосом у позвоночных животных и какие факторы влияют на данные процессы».

Глава 2 посвящена описанию используемых материалов и праймеров (подробный список приведен в таблицах в Приложении 1), выборки животных, от которых получены первичные клеточные культуры, а также применяемых методов и методик. В отдельном подразделе дано детальное описание клеточных культур и линий, используемых в исследовании. Для всех примененных цитогенетических и молекулярно-генетических методов приведено подробное описание. Общий объем раздела составляет 8 страниц.

Глава 3 занимает 25 страниц и состоит из трех подразделов, в которых представлены основные результаты исследования. В первом подразделе (3.1) приведены результаты анализа генетического состава половых хромосом заборной малахитовой игуаны (*S. malachiticus*). В ходе цитогенетического анализа оказалось, что кариотип этого вида ($2n=22$) соответствует описанному ранее; на рисунке 3 представлен проточный кариотип с 12 пиками. Используя сортировочные ДНК-библиотеки, специфичные для половых хромосом этого вида, автор подтвердила, что большинство зондов являются хромосомоспецифичными. Результаты этого эксперимента FISH с зондами, специфичными для хромосом X и Y, а также аутосомной пары 7 на метафазных пластинках самца *S. malachiticus* автор приводит на рисунке 4. Интересную картину показал паттерн С-окрашивания кариотипа *S. malachiticus* с использованием флуоресцентных красителей, где позитивные С-блоки были выявлены в перичентромерных участках всех хромосом, включая X и Y, при этом аутосомная пара 7 была почти полностью С-позитивна. Важные данные были получены при сравнении результатов секвенирования ДНК-библиотек *S. malachiticus* с геномом *Anolis carolinensis*: большинство макрохромосом этого модельного вида а) соответствуют таковым у анолиса и б) образовались в результате слияния как минимум двух пар предковых микрохромосом. Результаты отражены в таблице 1. Отдельный большой подраздел этой главы посвящен идентификации и локализации последовательностей сателлитной ДНК, специфичных для половых хромосом *S. malachiticus*. Результаты представлены на двух рисунках в тексте (5 и 6 на стр. 55-56) и на двух же в Приложении, и в объемной таблице 2 (стр. 51-54).

Второй подраздел (3.2) описывает результаты поиска предполагаемых половых хромосом и анализа их генетического состава у второго модельного вида – йеменского хамелеона (*C. calyptratus*). Кариотип изученной особи соответствовал описанному ранее для этого вида ($2n=24$), проточный кариотип показан на рис. 7 (стр. 57). Очень важным открытием автора является определение предполагаемой пары половых хромосом для

этого вида (пара 5), что было сделано с помощью ПЦР-ассоциированного картирования ранее описанных пяти Y-специфичных RAD-seq маркеров с использованием в качестве матрицы ДНК-библиотек, специфичных для отдельных хромосом (рисунок 8, стр. 58). Также примечательно, что при сравнении данных секвенирования ДНК-библиотек йеменского хамелеона с двумя другими видами рептилий автор выявила несколько слияний микрохромосом между собой, а также с макрохромосомами в геноме этого вида (таблица 3).

Секвенирование и дальнейший анализ геномной ДНК этого модельного вида *C. calyptratus* позволили автору выделить 5 последовательностей сатДНК и локализовать их на метафазных хромосомах исследуемого самца. Распределение кластеров сатДНК детально показано на рисунках 9 и 10 в тексте (стр. 61-62); отдельно хочется подчеркнуть результат по ко-локализации двух повторов с интерстициальными теломерными последовательностями на хромосоме 1. Судя по кариограмме на рисунке 10, блоки С-гетерохроматина на этой хромосоме (1) также локализованы интерстициально. Можно предполагать, что вероятно 1 пара аутосом образовалась относительно недавно в ходе эволюции кариотипа этого вида путем центрического слияния двух одноплечих хромосом, о чем свидетельствуют интерстициальные теломерные повторы.

В качестве замечания хотелось бы уточнить про метод установления предполагаемых половых хромосом у йеменского хамелеона *C. calyptratus*. Почему достоверный ПЦР-продукт показал только один из пяти маркеров?

В третьем подразделе (3.3) этой главы автор приводит данные о цитогенетическом сравнении и генетическом составе половых хромосом у двух модельных видов gekkonov. Эти виды интересны системой множественных половых хромосом $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ и, как отмечает автор, структура кариотипа исследованного в данной работе самца *C. mitratus* оказалась практически идентична описанному ранее для второго вида (*C. elegans*). Рисунок 11 (стр. 63) прекрасно отражает результаты FISH с зондами к 45S рДНК и теломерной ДНК, а также к половым хромосомам X и Y, однако у меня есть пара вопросов по этому рисунку.

Вопрос 1. На иллюстрации результатов FISH с зондами к 45S рДНК и теломерной ДНК на метафазных хромосомах *C. mitratus* (а) стрелками указаны только одна X хромосома (X_1), тогда как на остальных (б) и (в) обозначены X_1 и X_2 хромосомы. Упущение ли это или невозможно было выявить X_2 на метафазных пластинках в этом эксперименте?

Вопрос 2. Как были идентифицированы X1 и X2 хромосомы на метафазной пластинке, представленной на панели (б) рисунка 11 (стр. 63)?

При сравнении хромосомо-специфичных ДНК-библиотек *C. elegans* с двумя доступными референсными геномами автору удалось определить сходство половых хромосом изучаемого вида *C. elegans* с хромосомами этих референсных видов. Из таблицы 5 (стр. 64) хорошо видно, что каждая из половых хромосом *C. elegans* содержит последовательности двух-четырёх хромосом\хромосомных плеч или их фрагментов из кариотипов красноголового анолиса (*Anolis carolinensis*) или пятнистого зублефара (*Eublepharis macularis*)

В следующем подразделе (3.3.3) автором подробно отражены результаты идентификации и локализации 14 последовательностей сатДНК, специфичных для половых хромосом второго модельного вида gekkonov, *C. mitratus* (таблица 6, стр. 66-68). Автор провела кропотливую работу по подбору праймеров ко всем последовательностям сатДНК и сделала зонды, которые были локализованы на метафазных хромосомах *C. mitratus* с помощью FISH; результаты визуализированы на рисунке 12 (стр. 69). Интересными фактами оказалось то, что только один из 14-ти кластеров сатДНК локализовался на половых X и Y хромосомах, тогда как распределение большинства кластеров совпадала с локализацией C-позитивных блоков (рисунок 12, стр. 70).

Вопрос 3. Чем может быть обусловлено отсутствие выраженных сигналов последовательностей сатДНК на метафазных хромосомах самки юкатанского полосатого gekkona *C. elegans*?

Глава 4 посвящена подробному обсуждению полученных результатов по исследованиям половых хромосом у четырех модельных видов рептилий. Глава имеет несколько рубрикаций, что структурирует излагаемую информацию и упрощает ее восприятие читателем. В данном разделе также приведены основные итоги работы.

В главе 5 автором составлено общее Заключение по работе. Особо отмечено, что именно использование цитогенетических и биоинформатических подходов позволяет комплексно проанализировать генетический состав половых хромосом и дополнить современные представления об их эволюции. Несомненно, что и выбранные модельные виды имеют огромный потенциал для изучения подобных вопросов, а у автора остается еще много интересных эволюционно-цитогенетических вопросов, требующих изучения с помощью современных цитогенетических и биоинформатических методов.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения, все они очень хорошо визуализированы на рисунках и представлены в таблицах. Использование современных молекулярно-цитогенетических и биоинформатических методов хорошо обосновано. Новизна и актуальность представленного исследования также не вызывают сомнений, а выводы соответствуют поставленным цели и задачам. Теоретическая и практическая значимость работы обоснованы автором в полной мере.

Автореферат полноценно отражает основное содержание диссертационной работы. Основные части работы, а именно лабораторные эксперименты и часть биоинформатического анализа выполнена К.В. Тишаковой лично, что описано в соответствующем разделе диссертации.

Особо хочу отметить, что рукопись диссертации и автореферата написаны логично и очень грамотно; в тексте диссертации и автореферата присутствует лишь несколько пунктуационных ошибок и пара несогласований в падежах. Эти замечания носят технический характер и не снижают общего высокого уровня представленной работы.

Суммируя все вышеизложенное, хочу отметить, что данная работа является одной из немногих по половым хромосомам рептилий, если не единственной, которая сочетает в себе разнообразие лабораторных и биоинформатических методов исследования. Особо подчеркну, что выбранные модельные объекты – рептилии – это не самая простая группа в плане цитогенетических исследований. Все полученные результаты и их анализ свидетельствует о том, что К.В. Тишакова проявила себя как кропотливый исследователь с высоким потенциалом к дальнейшей научной деятельности.

По теме диссертационного исследования опубликовано 6 научных работ, включая 3 статьи в зарубежных рецензируемых журналах, входящих в международные базы цитирования (WoS, Scopus) и в перечень ВАК, а также 3 тезисов докладов. Результаты работы были представлены и обсуждены на трех российских и международных научных конференциях.

Полученные результаты и материалы диссертации могут быть использованы в ведущих исследовательских институтах и университетах, таких как МГУ им. М.В. Ломоносова, ИПЭЭ РАН, ИОГЕН РАН, ИЦиГ СО РАН, ИЭРИЖ УрО РАН, ИСиЭЖ СО РАН, ЗИН РАН и др., где проводятся научные исследования по генетике, герпетологии и эволюции, при проведении природоохранных мероприятий, в лекционных и практических курсах по цитогенетике в высших учебных заведениях.

