

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Соболевой Евгении Сергеевны
на тему «Молекулярно-генетический анализ точек разрывов фиксированных
и полиморфных инверсий в X хромосоме малярийного комара *Anopheles mes-*
seae», представленную на соискание ученой степени кандидата биологиче-
ских наук по специальности 1.5.7. Генетика
в диссертационный совет 24.1.239.01 при ИЦиГ СО РАН

Anopheles messeae и близкородственный ему вид-двойник *Anopheles daciae* (оба входят в комплекс *Anopheles maculipennis*) являются наиболее широко распространенными переносчиками малярии в умеренном поясе Евразии. Другие представители группы *Anopheles maculipennis* так же важны в Евразии и их ареалы меняются в последние годы в связи с изменением климата. Таким образом, любые популяционно-генетические работы, сделанные на этой группе комаров, имеют большое значение, так как позволяют вести мониторинг и сравнение с данными, собранными в течение уже более полувека. Считается, что хромосомные инверсии важны для понимания эволюции и экологии видов, так как, защищая лежащие в пределах инверсии гены от рекомбинации, могут участвовать в формировании экологических адаптаций, устойчивости к инсектицидам и репродуктивной изоляции этих видов. Несмотря на давнюю историю изучения инверсионного полиморфизма малярийных комаров комплекса *Anopheles maculipennis*, до недавнего времени отсутствовали точные геномные координаты точек разрывов хромосомных перестроек. В связи с этим, сценарий хромосомной эволюции внутри группы оставался невыясненным. Только для одного вида группы, *Anopheles atroparvus*, есть геномная сборка. Отсутствие геномной сборки делает невозможным прямое применение стандартных биоинформатических подходов для локализации перестроек. В связи с этим разработка альтернативных молекулярно-цитогенетических подходов и специализированного программного обеспечения, способных решать задачи геномного картирования и филогенетической реконструкции в условиях дефицита референсных данных выглядят актуальными. Решение этих задач, представленное в диссертационном исследовании, с одной стороны, расширяет фундаментальные представления о хромосомной эволюции малярийных комаров, с другой стороны, закладывает методическую основу для изучения геномов других немодельных организмов.

Используя гибридизацию *in situ* проб, подобранных с использованием референсного генома близкого вида, Евгений Сергеевнe удалось получить новые данные, которые позволили значительно продвинуться в понимании хромосомной эволюции X-хромосомы у *An. messeae* и *An. daciae*, а также завершить реконструкцию общей картины эволюции половой хромосомы в подгруппе *Maculipennis*. Впервые показано, что эволюцию X-хромосомы *An. messeae* после дивергенции с *An. maculipennis* сопровождали две вложенные одна в другую парацентрические инверсии. Эта комбинация инверсия создала синтенные блоки, защищенные рекомбинацией. Евгений Сергеевнe удалось убедительно показать, что гены в этих синтенных блоках связаны с иммунным ответом, нейрорегуляцией и половым поведением. Таким образом, выявлены новые перспективные локусы для исследования механизмов репродуктивной изоляции и адаптации к специфическим условиям обитания у малярийных комаров. Разработанная в работе методология может быть использована для картирования хромосомных перестроек у других немодельных организмов.

Диссертация построена по классическому плану, включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы (238 источника). Общий объем составляет 146 страниц машинописного текста. Текст работы содержит 23 рисунка, 7 таблиц и 5 приложений.

В разделе «Введение» кратко охарактеризована актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, кратко перечислены основные методы исследования, а также приведены положения, выносимые на защиту, сведения о степени личного вклада автора, данные об апробации результатов и о публикациях по теме диссертационной работы.

Обзор литературы включает обсуждение общих вопросов, связанных с хромосомными перестройками. Мне показалось, что эта часть обзора написана по шаблонам очень старых работ лаборатории, так как почти не содержит ссылок на современные статьи и обзоры. В ней много неудачных формулировок и внутренних противоречий. Другая часть обзора литературы, посвященная классификации и эволюционной цитогенетике комаров рода *Anopheles*, написана более современно, чувствуется личный вклад автора в анализ литературы. В целом обзор литературы достаточно полно охватывает всю проблематику, необходимую для понимания результатов работы.

В главе «Материалы и методы» описан сбор материала, видовая идентификация комаров при помощи ПЦР, ряд стандартных молекулярно-

биологических методов, гибридизация *in situ*, а также ряд биоинформатических методов, в том числе разработанный в рамках работы алгоритм для анализа вероятной последовательности событий при возникновении наблюдаемой картины хромосомных перестроек.

В главе «Результаты» в подразделе 3.1 описывается разработка метода итеративного картирования. Подход, на первый взгляд, основан на достаточно очевидных положениях, но требует очень четкого и методичного планирования эксперимента, чтобы минимизировать число гибридизаций и четко ответить на поставленные вопросы. Следующие главы показывают, что подход очень хорошо себя показал при определении районов, содержащих точки разрыва фиксированных инверсий в X-хромосоме *An. messeae* (раздел 3.2) и полиморфных инверсий (раздел 3.3).

Результаты картирования точек разрыва фиксированных инверсий, то есть, инверсий, характерных для всех представителей *An. messeae*, обобщены на рисунке 12. Это очень важный и показательный рисунок. Если вернуться к нему после прочтения всех результатов, становится понятно, что он лучше всего иллюстрирует, что именно две вложенные фиксированные инверсии различают X-хромосомы *An. messeae* и *An. atroparus*. Хорошо видно, что эти инверсии привели к транслокации и развороту двух относительно небольших синтенных блоков, который очевидно должны избегать рекомбинации при межвидовых скрещиваниях.

Мне показалось не очень удачным решением, что ось координат в «а» нарисована с разрывами, обозначенными очень мелким пунктиром, а синтенные блоки — без разрывов, поэтому соотношение их размеров плохо воспринимается и кажется, что «а» и «б» противоречат друг другу.

В главе 3.3 картируются присутствующие с высокой частотой в популяциях *An. messeae s.l.* полиморфные инверсии X1 и X2. Здесь итеративное картирование применяется к каждой инверсии по-отдельности, для каждой рисуется «сценарий» возникновения. И если для каждой инверсии отдельно результат выглядит просто и понятно, то при объединить эти результаты друг с другом и с результатами картирования фиксированных перестроек, становится очевидной необходимость какого-то подхода, который моделировал бы возможные сценарии последовательности инверсионных событий. и именно это делается в следующей главе.

В главе 3.4 «Реконструкция эволюции X-хромосомы *An. messeae* и *An. daciae*» на основании полученных данных хромосома разбивается на восемь синтенных блоков. Очень наглядная схема на рисунке 16 уже позволяет увидеть наиболее вероятные сценарии эволюции, далее автор разрабатывает

специальный компьютерный алгоритм, позволяющий выбрать наиболее вероятный сценарий.

Эта глава является яркой иллюстрацией, как выбранный автором подход итеративного картирования отдельных инверсий позволяет получить представление о возможных эволюционных сценариях их появления. Можно полагать, что более детальное картирование, которое станет возможным после аннотации соответствующих геномов, позволит уточнить полученные результаты и сделать более обоснованные выводы о механизмах возникновения инверсий.

У меня возник вопрос о возможностях созданного алгоритма: нельзя ли применять эту же программу не только к синтенным блокам, но и к генам вокруг точек разрывов, чтобы построить сценарий их эволюции (например, для анализа генов, приведенных в приложении Г)

Глава 3.5 называется «Анализ частоты разрывов в районах гомеологичных BR у других представителей *Anopheles*». На мой взгляд, заголовок сформулирован не очень корректно, так как «частоты» здесь не анализируются. В анализ берутся четыре точки разрыва инверсий, фиксированных у *Anopheles messeae*, анализируется наличие/отсутствие разрыва у видов анофелесов, для которых доступна геномная сборка. Смотрится взаимное расположение генов по обе стороны от точки разрыва. Далее делается попытка построить эволюционный сценарий поведения точек разрывов в эволюции. Результаты анализа очень наглядно представлены на рисунке 19. Глядя на этот рисунок, у меня возник ряд вопросов к интерпретации результатов. 1) Сборка генома, вероятно, основана на результатах секвенирования какого-то одного генотипа. Как учитывается существование полиморфных вариантов у каждого вида. Не может ли повлиять на выводы работы ситуация, когда в анализ попал не типичный представитель. 2) Не очевидно, насколько картина, представленная на рис. 19 соответствует сценарию двух последовательно возникших вложенных инверсий, где точки разрыва должны были быть 1+4 и 2+3.

К главе 3.6 «Молекулярно-генетический состав окрестностей точек разрывов фиксированных инверсий» у меня тоже возник вопрос. Евгения Сергеевна предполагает, что именно наличие транспозонов способствовало возникновению в эволюции горячих точек для появления инверсий. В то же время, в обсуждении приведен очень наглядный рисунок 23, который показывает, что транспозоны разбросаны по геному *An. messeae* достаточно равномерно. Таким образом, зон обогащения много, но в эволюции фиксируется лишь небольшое число крупных, выявляемых цитологическими методами,

инверсий. На мой взгляд, интересно было бы разделить и обсудить отдельно потенциальные механизмы возникновения де ново и фиксации инверсий в популяции.

Последняя глава результатов 3.7 «Функциональная характеристика генов с использованием генной онтологии» мне очень понравилась. В ней убедительно показано, что среди генов, попавшие в два коротких закрепленных в группе *An. messeae* и *An. daciae* синтенных блока, есть много генов, связанных с иммунным ответом, нейрорегуляцией и половым поведением. Выглядит очень перспективным дальнейшее исследование взаимодействий между генами, попавшими в эти синтенные блоки. Это может привести к открытию новых механизмов адаптации комаров к различным условиям.

В следующей главе Евгения Сергеевна обсуждает полученные результаты. Здесь мы, наконец, видим ссылки на обзорные статьи последних лет, посвященные вопросам роли инверсионного полиморфизма в эволюции.

Раздел 4.1 «Реконструкция эволюции X-хромосомы в филогенетической ветви *Anopheles messeae s.l.*» написан очень тяжело. Вся глава написана с упором на критический анализ старинных работ В. Стегния, а не на обобщение литературных и полученных в работе результатов для построения нового эволюционного сценария.

Далее следует раздел 4.2 «Повторное использование точки разрыва инверсии». Здесь мне тоже понятны на все утверждения автора. «Подобная концентрация разрывов в ограниченном геномном регионе может косвенно указывать либо на повышенный уровень рекомбинации в данном участке генома среди других *Anopheles* (что в целом, согласуется с рисунком 17)». Не понятно, что имеется в виду под повышенным уровнем рекомбинации. Не понятна ссылка на рисунок 17 (на рисунке 17 – интерфейс программы)

В тексте говорится о том, что район около 2Мб является горячей «точкой» возникновения инверсий. Возникает вопрос о разрешении анализа. Для представителей рода *Drosophila* после сборки первых 9 геномов были выделены общие для 9 видов синтенные блоки. Оказалось, что все хромосомы распадаются на множество небольших синтенных блоков, самые длинные из которых несут лишь 30-40 генов. В связи с этим возникает вопрос, на каком масштабе уместно говорить о «горячей точке разрыва».

Далее в этой главе обсуждаются литературные данные о корреляциях между присутствием определенных инверсий и природными условиями. Интересно мнение автора, не могли ли какие-то из полиморфных инверсий возникнуть у общего предка исследованных видов и сохраняться очень длительное время как сбалансированные полиморфные инверсии.

В главе «Заключение» формулируются выводы исследования, которые соответствуют поставленным задачам.

Несмотря на высказанные выше замечания, я считаю, что работа Евгении Сергеевны является актуальным и интересным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. В нем несомненно присутствуют новизна и оригинальность. Все полученные результаты воспроизводимы и статистически достоверны. Сделанные выводы полностью обоснованы приведенными в работе экспериментальными данными и соответствуют поставленным задачам. Результаты работы опубликованы в трех статьях в международных журналах, в том числе, Q1-Q2. Хочется обратить внимание, что во всех работах Евгения Сергеевна является первым автором. Кроме того, результаты работы были представлены на 10 конференциях международного и всероссийского уровня.

Таким образом, я считаю, что по поставленным задачам, уровню их решения и новизне полученных результатов диссертационная работа Соболевой Евгении Сергеевны полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в текущей редакции), представляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Соболева Евгения Сергеевна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории молекулярной цитогенетики
ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
доктор биологических наук (03.01.07 – Молекулярная генетика)
Колесникова Татьяна Дмитриевна


23.09.2026

адрес: ИМКБ СО РАН, просп. акад. Лаврентьева 8/2, Новосибирск, 630090, Россия
Тел: (383) 363-90-42
email: kolesnikova@mcb.nsc.ru

Даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ИЦиГ СО РАН и федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их аттестационное дело соискателя и дальнейшую обработку.

Подпись Колесниковой Т.Д. заверяю.
Ученый секретарь ИМКБ СО РАН,
кандидат биологических наук





/Ахмерова Лариса Григорьевна/