

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Лобова Арсения Андреевича на тему: «Белки взаимодействия гамет как факторы репродуктивной изоляции криптических видов рода *Littorina* Férussac, 1822», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Изучение процессов формирования репродуктивной изоляции в ходе видообразования, в особенности симпатрического, имеет важное значение для теоретической разработки понятия «вид» – одного из центральных в эволюционном учении. Развитие молекулярной биологии привело к новому витку дискуссий в этой области. В частности, в современной научной литературе, большое внимание уделяется феномену криптических видов и микроэволюционных процессов, связанных с их появлением. Активно обсуждаются механизмы, способные ограничивать поток генов между криптическими группами. Важную роль в создании таких репродуктивных барьеров может играть несовместимость гамет, основанная на взаимодействии высокоспециализированных белков взаимодействия гамет (БВГ). К настоящему моменту БВГ изучены только у ряда беспозвоночных с наружным оплодотворением и нескольких видов насекомых с внутренним оплодотворением. При этом в литературе отсутствуют данные о молекулярных основах взаимодействия гамет у представителей многих крупных таксонов.

Все это определяет актуальность и значимость работы Лобова Арсения Андреевича, посвященной изучению молекулярных механизмов несовместимости гамет в модельной системе криптических видов рода *Littorina*. Ни молекулярные механизмы взаимодействия гамет, ни феномен несовместимости гамет между криптическими видами рода *Littorina* не становились предметом исследований ранее. Фактически, работа сосредоточена не столько на эволюционно-биологических исследованиях, сколько на разработке модельной системы для таких исследований: описании и идентификации белков, потенциально вовлеченных в несовместимость гамет.

Основная часть диссертации разделена на обзор литературы (первая глава) и четыре главы, посвященные описанию экспериментальных данных, полученных автором. Во второй главе, посвященной анализу прекопулятивных репродуктивных барьеров у моллюсков рода *Littorina*, Лобов А.А. показал, что такая изоляция между видами является частичной и неполной. Вместе с данными об отсутствии потока генов между криптическими группами, этот результат ставит вопрос о наличии дополнительных механизмов, определяющих репродуктивную изоляцию особей.

Этому, посткопулятивному, уровню репродуктивной изоляции, связанному с несовместимостью гамет, посвящены последующие главы диссертации. В третьей главе для идентификации видоспецифичных белков взаимодействия гамет моллюсков рода *Littorina* был проведен протеомный анализ семенные везикул, простаты и пениса моллюсков. В трех проанализированных компартментах диссертантом выявлен ряд тканеспецифичных белков, потенциально связанных с процессами взаимодействия гамет. Часть из этих белков оказалась видоспецифична: шесть белков простаты *L. fabalis*; два белка простаты *L. compressa*; пять белков предположительно пениального эпителия *L. saxatilis/L. arcana*; два белка семенных везикул *L. obtusata* (LOSP-A и LOSP-B). Наблюдаемая ткане- и видоспецифичность делает их потенциальными кандидатами на роль белков, вовлеченных в несовместимость гамет. Однако ни один из этих белков не удалось определить при помощи масс-спектрометрии по имеющимся базам данных.

В четвертой главе диссертант сфокусировался на изучении наиболее перспективного спермального белка LOSP, так как на других моллюсках с внешним оплодотворением ранее было показано, что именно спермальные белки участвуют в несовместимости гамет. Было показано, что белок LOSP в больших количествах накапливается в параспермах – стерильном типе сперматозоидов, передающемся самке во время осеменения параллельно с фертильной эуспермой. Несмотря на то, что функция этого белка неизвестна, его передача

09/2-02-60 от 01.02.2021 г.

самке может свидетельствовать в пользу того, что она связана с оплодотворением. LOSP не имеет гомологов в базах данных и, по-видимому, относится к не описанному ранее семейству.

Расшифровка последовательности белка LOSP с помощью N-концевого секвенирования по Эдману с последующей RACE-амплификацией кДНК позволила автору проанализировать его первичную структуру и показать наличие в его составе множества неорганизованных участков, не имеющих в нормальных условиях стабильной мономерной структуры, за исключением N-концевой альфа-спирали, которая может связываться с другими белками. Несоответствие предсказанной молекулярной массы белка размерам LOSP-A, и LOSP-B, наблюдаемым при электрофорезе позволило автору предположить его протеолитическое созревание по двум предсказанным сайтам протеолиза. Продукты такого протеолиза по своему размеру соответствуют белкам LOSP-A и LOSP-B. Иммуноблоттинг также подтвердил это предположение, так как поликлональные анти-LOSP антитела окрашивали два белка, соответствующие по массе LOSP-A и LOSP-B. В составе белка LOSP также были обнаружены N-концевой сигнальный секреторный пептид и семь повторов AVAEAEHGG. РНК-гибридизация *in situ* показала присутствие мРНК LOSP в гонаде, но не в семенных везикулах. При иммуногистохимической окраске LOSP был обнаружен как в зрелых параспермах в семенных везикулах, так и в параспермальных предшественниках гонад. Больше увеличение показало накопление белка в LOSP-содержащих везикулах в цитоплазме клеток.

Последняя глава посвящена анализу внутри- и межвидового полиморфизма белка LOSP. При этом было показано, что в группе *L. saxatilis/L. arcana*, где прекопулятивные барьеры наименее эффективны, наблюдается высокий полиморфизм LOSP. В то же время, у *L. obtusata* наибольшая эффективность прекопулятивных репродуктивных барьеров сопровождается наименьшим уровнем внутривидового полиморфизма LOSP. Обнаруженный паттерн полиморфизма белка LOSP оказался аналогичен паттерну некоторых описанных ранее белков несовместимости гамет, например, лизина моллюсков рода *Haliotis*. Этот результат косвенно указывает на связь LOSP с несовместимостью гамет. Однако, полученных данных недостаточно для адекватной трактовки этого паттерна. Это одна из немногих не опубликованных частей работы, которая, по-видимому, требует дополнительных исследований.

Диссертация Лобова А.А. представляет мультидисциплинарное исследование на стыке биохимии, клеточной и эволюционной биологии. Но, несмотря на такую разнонаправленность, хотелось бы отметить цельность работы – каждый этап исследования логически вытекает из предыдущего. Интересно, что, несмотря на большой объем проделанной работы, эти исследования все еще далеки от завершения – полученные данные ставят больше вопросов, чем ответов и на их основе можно провести еще множество исследований, способных стать основой докторской или других кандидатских диссертаций.

Работа выполнена на высоком методологическом уровне и нет никаких сомнений в достоверности, качестве и оригинальности полученных данных. Это подтверждает и тот факт, что на основе проведенных исследований уже опубликовано шесть статей в рецензируемых международных журналах WoS/Scopus и как минимум еще одна статья может быть опубликована в будущем. Впечатляет объем работы, проделанной лично автором и разнообразие использованных методов, многие из которых не тривиальны в применении к немодельным объектам.

Среди недостатков данной работы можно отметить некоторое количество опечаток, стилистических и орфографических ошибок. Некоторые сомнения вызывает вольность трактовки полиморфизма LOSP, приведенная автором в конце главы «Полиморфизм LOSP как фактор репродуктивной изоляции моллюсков рода *Littorina*». Очевидная причина этого – незавершенность этой части, которая ни в коей мере не уменьшает достоинства данной работы, особенно на фоне большого объема материала, изложенного в предыдущих частях.

Кроме того, заключения и выводы, в том числе по полиморфизму LOSP, сформулированы удачно и полностью обоснованы.

Таким образом, диссертация Лобова Арсения Андреевича на тему: «Белки взаимодействия гамет как факторы репродуктивной изоляции криптических видов рода *Littorina* Férussac, 1822» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 01.09.2016 № 6821/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Лобов Арсений Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология. Пункт 11 указанного Порядка диссертантом не нарушен.

Член диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
заведующий Лабораторией  
молекулярной защиты растений,  
Всероссийский Научно-Исследовательский  
Институт Защиты Растений (ВИЗР)



Долгих Вячеслав Васильевич  
29.01.2021