

## **Отзыв**

**официального оппонента доктора биологических наук Кулуева Булата Разяповича на диссертационную работу Кирова Ильи Владимировича «Особенности организации повторяющихся элементов геномов растений, выявленные с помощью новых омиксных подходов», представленную в диссертационный совет 24.1.088.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика (биологические науки)**

### **Актуальность исследования**

Более половины генома растений состоит из повторяющихся элементов, включая высококопийные тандемные повторы и мобильные элементы, которые, судя по всему, играют важную роль в эволюции и онтогенезе растений. Несмотря на то, что для изучения геномов растений используются различные цитогенетические методы, технологии секвенирования нового поколения, а также многочисленные биоинформатические подходы, структура, закономерности инсерций, жизненный цикл, механизмы экспрессии и функции повторяющейся ДНК остаются малоизученными. Это в первую очередь связано с многочисленными трудностями при изучении этих компонентов генома и несовершенства методической базы. В этой связи, исследования направленные на разработку методов и технологий изучения тандемных повторов и мобильных генетических элементов актуальны. Отработка новых технологий и компьютерных программ на модельных растениях позволит в будущем их применять на любых растительных объектах. Данное направление работ актуально для развития фундаментальной науки, так как позволит приблизиться к пониманию роли повторяющихся элементов в функционировании геномов растений при индивидуальном развитии и филогенезе. Накопление знаний в этой области будет способствовать разработке в будущем технологий воздействия на растительные геномы с целью создания новых форм с хозяйственно-ценными признаками.

### **Структура диссертационной работы**

Диссертация И.В. Кирова изложена на 266 страницах текста, состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», а также Заключение, Выводов, Списка публикаций и Списка литературы. Работа

иллюстрирована 79 рисунками и содержит 14 таблиц. Список литературы насчитывает 475 наименований.

Во введении И.В. Киров дает обоснование актуальности выбранной темы, четко определяет цель работы (системное изучение повторяющихся элементов (сателлитных повторов и мобильных элементов) геномов разных видов растений и разработка для этого новых молекулярных и биоинформатических подходов) и формулирует задачи, необходимые для достижения поставленной цели, приводит положения, выносимые на защиту, дает авторскую оценку научной новизны и практической значимости выполненной научно-исследовательской работы. Диссертационная работа характеризуется высоким уровнем личного вклада соискателя во всех проведенных экспериментальных работах. Основные результаты были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Диссертационная работа прошла апробацию на 12 российских и международных научных конференциях, результаты исследования изложены в 18 публикациях в журналах из перечня ВАК, из которых 11 – статьи в журналах Q1 WOS. Весьма примечательной и положительной стороной работы является то, что результаты исследования опубликованы в высокорейтинговых журналах, к примеру, это журналы *Journal of Integrative Plant Biology*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Plants*, *Frontiers in Plant Science*, *Nature Plants* и другие. Однако среди публикаций есть только одна статья в российском журнале, поэтому можно сделать пожелание диссертанту публиковать результаты своих исследований и в отечественных журналах.

В литературном обзоре И.В. Киров подробно освещает современное состояние изучаемой проблемы. Первая часть обзора литературы посвящена описанию классификации повторяющихся элементов генома. Далее автор дает подробную информацию об LTR ретротранспозонах растений. Третья часть обзора посвящена ретротранскриптому растений и методам их изучения. В следующем параграфе освещаются вопросы формирования и методы изучения мобилома. Далее идет отдельный параграф, посвященный методам идентификации сателлитных повторов у растений. Обзор литературы очень подробный, написан понятным языком, содержит много современной научной информации и может быть рекомендован для использования в учебном процессе у студентов биологических специальностей. При прочтении обзора формируется общее представление об известной информации о большом разнообразии, классификации и роли тандемных повторов и мобильных генетических элементов в функционировании генома.

Необходимо отметить, что И.В. Киров провел весьма значительную аналитическую работу с большим числом литературных данных, в том числе опубликованных за последние 5 лет, которые включены в список цитированной литературы. Обзор литературы

непосредственно связан с предметом исследований и в нем достаточно полно отражены современные тенденции в изучении повторяющихся ДНК и технологии, используемые для их изучения. При прочтении обзора литературы возникает понимание научной новизны и практической значимости диссертационной работы. В целом ознакомление с обзором литературы подводит читателя к существованию большого числа вопросов и проблем в рассматриваемой области, на решение которых и была направлена диссертационная работа И.В. Кирова.

В главе «Материалы и методы» приведены краткая характеристика объектов исследования и описание использованных в ходе работы методов. Работа характеризуется использованием современных методов молекулярной генетики и биоинформатики. Положительной особенностью диссертационной работы является широкое использование современных цитогенетических, транскриптомных и биоинформатических подходов. Диссертантом также применялись методы молекулярной биологии: ПЦР, ОТ-ПЦР, клонирование, полногеномное секвенирование и др. В главе 3 описываются методы выделения ДНК, РНК, белков. Изложены использованные биоинформатические подходы для характеристики репитома и идентификации tandemных повторов с помощью коротких ридов, а также описаны RNAseq анализ, идентификация экспрессирующихся ретротранспозонов, оценка времени инсерции, расчёт расстояния между генами и RTE, анализ мобилома, предсказание длинных некодирующих РНК и масс-спектрометрический анализ. В целом, протоколы в главе «Материалы и методы» описаны достаточно подробно и позволяют провести повторные эксперименты другими исследователями.

Самая большая глава диссертационной работы посвящена описанию результатов исследования и их обсуждению. Первая часть главы 4 посвящена описанию и обсуждению результатов цитогеномного анализа новых сателлитных повторов растений. Здесь даются результаты использования новых компьютерных программ ruTanFinder, nanoTRF, DRAWID. Далее идет описание и обсуждение результатов исследования tandemных повторов ряда видов лука, розы и мха *Physcomitrella patens*. Вторая часть главы посвящена описанию результатов исследований ретротранскриптома на примере подсолнечника и тритикале и обсуждению этих результатов. В третьей части главы дается описание результатов исследования особенностей инсерции активных мобильных элементов растений. Следующая часть посвящена структуре и составу внехромосомных кольцевых ДНК LTR ретротранспозонов растений. В последней пятой части главы 4 представлены результаты исследований протеома мобильных элементов. После главы 4 дается заключение по всем полученным в ходе работы результатам исследования. В заключении кратко перечисляются самые важные результаты исследования. Здесь же автор рассуждает о практической значимости полученных результатов исследования.

Выводов приводится 6, сформулированы они четко, непосредственно вытекают из полученных данных и понятны для читателя. Диссертационная работа И.В. Кирова, в целом, написана хорошим научным и понятным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки и обсуждены с привлечением широкого круга литературных данных. В целом, в тексте допущено довольно мало ошибок, текст изложен в логичном порядке и при прочтении возникает четкое убеждение о целостности и завершенности диссертационной работы.

После чтения всей диссертационной работы необходимо отметить основные положительные моменты. В обзоре литературы очень подробно описаны тандемные повторы и мобильные элементы генома, и самые современные методы их исследования. Обзор литературы иллюстрирован большим числом рисунков, которые позволяют лучше понять суть излагаемого текста. Диссертация изобилует терминами с окончанием -ом: репитом, мобиллом, сателлитом, циркулом и др., некоторые из которых, судя по всему, впервые используются на русском языке в рамках данной диссертационной работы. В рамках диссертации был создан целый арсенал методов для поиска и анализа сателлитных повторов (pyTanFinder, nanoTRF, DRAWID) и инсерций мобильных элементов (NanoCasTE, CANS, nanotei) в геномах растений. Впервые идентифицированы новые высококопийные тандемные повторы для разных видов растений. Большой интерес представляют полученные автором данные о кодировании мобильными генетическими элементами белков с неизвестной функцией, что требует дальнейших исследований. В рамках диссертационной работы широко используется технология нанопорового секвенирования. Все исследования проведены на высоком уровне, что видно также по уровню статей по теме диссертации, большинство из которых опубликованы в журналах Q1 WOS. В целом, диссертационное исследование И.В. Кирова — это фундаментальный и довольно сложный научный труд, так как там описывается большое количество экспериментов и исследований, используются новейшие методы геномики растений, а полученные результаты обсуждаются с привлечением литературных сведений.

### **Научная новизна и практическая значимость полученных результатов**

В рамках диссертационной работы разработан комплекс биоинформатических и молекулярно-генетических методов, направленных на идентификацию новых повторяющихся элементов геномов растений и изучение генетической вариабельности, обусловленной этими элементами, включая поиск новых инсерций мобильных элементов. Впервые идентифицированы новые высококопийные тандемные повторы для разных видов растений (*A. fistulosum*: AfiCen1K; *A. cepa*: TR2CL37, *R. wichurana* CL8, CL24; *R. chinensis*: CL226; 19

повторов для *P. patens*). Благодаря адаптивному нанопоровому секвенированию вкДНК и кДНК/РНК были также идентифицированы новые мобильные элементы с доказанной мобильной активностью в геноме тритикале (ретротранспозон 'MIG'), подсолнечника (ретротранспозоны 'Gagarin' и 'SUNTY3'), рапса (семейство ретротранспозонов 'Antares') и арабидопсиса ('TR-GAG' элемент). Диссертантом с использованием методов нанопорового секвенирования РНК/кДНК, RNAseq и ОТ-ПЦР в ходе многочисленных исследований убедительно доказано, что как ретротранспозоны, так и транспозоны транскрибируются. Анализ протеома показывает, что часть РНК мобильных элементов еще и транслируется с образованием как белков с известной функцией, так и неизвестных белков. Автором также получены доказательства роли метилирования ДНК в локализации инсерций мобильных элементов. Практическая значимость работы заключается в том, что разработанные программы и технологии могут быть использованы при изучении tandemных повторов и мобильных генетических элементов у различных видов растений. Полученные результаты поднимают вопросы о значении tandemных повторов и мобильных генетических элементов в эволюции и селекционном процессе, а также о функциональной значимости их транскриптов и белков как для самих этих повторяющихся элементов, так и для растительной клетки.

### **Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертационной работы**

Использование для исследований современных методов молекулярной биологии, геномики и биоинформатики таких как RNAseq, клонирование и секвенирование, FISH, GISH, флуоресцентная микроскопия, нанопоровое секвенирование ДНК, сборка и анализ ридов ONT и Illumina, выделение и секвенирование внехромосомных кольцевых ДНК, масс-спектрометрический анализ тотального белка, Cas9-опосредованное секвенирование и др. подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в работе И.В. Кирова, а также выносимых на защиту положений и выводов. Во всех исследованиях выбранные методы адекватные, результаты статистически обработаны. Приведенные данные в таблицах, гистограммах и графиках позволяют проверить соответствующими методами правильность расчетов, а также выводов, сделанных диссертантом. Автор тщательно проверяет полученные данные, оценивает достоверность различий с использованием стандартных методов статистики. Таким образом, полученные И.В. Кировым научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Следует отметить и то, что основные результаты диссертации И.В. Кирова опубликованы в

высокорейтинговых журналах, а также апробированы в научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

В ходе чтения к диссертационной работе возникли следующие вопросы:

1. Стр. 32. «Организация генома LTR ретротранспозона» – правильно ли рассуждать о геноме ретротранспозона?

2. 21. Стр. 83. «Иногда хромосомы имеют слабые места». Что означает слабые места?

3. Весьма интересны данные о том, что хлоропластная ДНК переносится в том числе и в центромерные области хромосом. А какие хлоропластные последовательности ДНК обнаруживаются в центромерах хромосом лука или других растений?

4. Показано, что повторы AfCen1K и AcCen1K транскрибируются у *A. fistulosum* и *A. sera*, но транскрипты не полиаденилированы. Есть ли какая-то функция у этих транскриптов, подвергаются ли они процессингу, трансляции?

5. Судя по результатам диссертации и данным литературы стрессовые условия активируют экспрессию ретротранспозонов и транспозонов. Есть ли данные о биологической функции такого явления? Известны ли какие-либо исследования, направленные на создание стрессоустойчивых растений путем воздействия на мобильные генетические элементы абиотическими стресс-факторами?

6. При исследовании экспрессии ретротранспозонов у ряда растений автором было показано, что чаще всего активные LTR экспрессируют белки GAG и в меньшей степени другие белки. Известны ли функции этих белков GAG в клетке растений?

7. На примере двух видов гречихи показано, что культурный вид имеет в 2 раза больше ретротранспозонов. Есть ли похожие данные по другим культурам и связан ли как-то выявленный факт с хозяйственно-ценными признаками культурного вида?

8. Проведённые автором исследования показывают, что мобильные элементы могут кодировать и белок Env, есть ли какие-либо данные о функциях этого белка для хозяйской клетки растений или для ретротранспозонов?

**К диссертационной работе имеется несколько замечаний.**

К главе 1 «Обзор литературы» нет заключения, который должен подвести к цели исследования. В главе 3 «Материалы и методы» не обоснован выбор референсных генов для ОТ-ПЦР. В главе 3 не описан протокол метода Cas9-опосредованного секвенирования, дается лишь ссылка на статью. В тексте диссертации не цитируются русскоязычные источники. Результаты некоторых исследований, к примеру по внехромосомным кольцевым ДНК,

протеому мобильных элементов недостаточно обсуждены с привлечением данных литературы. Выводу 5 не хватает конкретизации, так как остается непонятным о каких именно эпигенетических и транскриптомных особенностях идет речь.

**Также можно отметить несколько замечаний редакторского характера:**

1. Стр. 24. DIRS элементы отмечаются как подкласс, а далее ниже, как порядок. Как правильно?

2. Стр. 31 и в других местах по тексту диссертации. Согласно Neuman et al. (Neumann et al., 2019) – следует давать автора только один раз - Согласно Neuman et al. (2019).

3. Стр. 34 и в других местах по тексту диссертации. (Laten & Gaston, 2012; Vicient et al., 2001; Vicient & Casacuberta, 2020; Wright & Voytas, 2002) источники расположены не в хронологическом порядке.

4. Стр. 39. включая подсолнечник (Kirov et al., 2020) и тритикале (Kirov et al., 2020) – видимо речь идет о двух разных статьях, потому их следовало обозначить, как Kirov et al., 2020a и Kirov et al., 2020b.

5. Стр. 61. Правильное название вектора – pAL2-T или pAL-TA, но не pAL-T.

6. Стр. 68. «Таблица 3.5 – Последовательности пар праймеров, использованных в данном исследовании» – в названии таблицы должна быть более полная информация об исследовании.

7. Стр. 114. «Анализ результатов показал, что от 32% до 39% генома приходится на высоко- и среднеповторяющиеся последовательности (Рисунок 4.18)». Но на рисунке изображено наоборот. Как правильно?

Сделанные в отзыве замечания не влияют на актуальность, новизну, практическую значимость и фундаментальный характер полученных выводов диссертационной работы.

## **Заключение**

Диссертационная работа Ильи Владимировича Кирова «Особенности организации повторяющихся элементов геномов растений, выявленные с помощью новых омиксных подходов», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика (биологические науки) является законченным научным исследованием, в котором получены данные о повторяющихся элементах геномов разных видов растений и разработаны новые молекулярные и биоинформатические подходы для их изучения. По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской

Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 с изм. от 26.05.2020), а ее автор Киров Илья Владимирович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика (биологические науки).

доктор биологических наук  
по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология,  
Заведующий лабораторией геномики растений  
Института биохимии и генетики – обособленного структурного  
подразделения Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения Уфимского федерального исследовательского  
центра Российской академии наук, доктор биологических  
наук



Булат Разяпович Кулуев

15.08.2024 г.

Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71  
ibg.anrb.ru, e-mail: molgen@anrb.ru, kuluev@bk.ru  
Тел.: +7 (347) 2356100, +7 (347) 2356088

Подпись Кулуева Б.Р. заверяю,  
ио директора ИБГ УФИЦ РАН



Карунас А.С.