

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт этнологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), академик РАН



1 сентября 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе **Добрынина Павла Владимировича** на тему **«Сборка и аннотация генома африканского гепарда, *Acinonyx jubatus*»**, представленной соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Добрынина П.В. посвящена секвенированию и биоинформатическому анализу генома африканского гепарда. Актуальность работы обоснована сразу несколькими обстоятельствами.

Во-первых, африканские гепарды являются уникальными обитателями Африки к югу от Сахары и Юго-Западной Азии. Это единственный современный представитель рода *Acinonyx*. Гепарды - редкие животные, находящиеся под угрозой исчезновения. В 2016 году глобальная популяция гепарда оценивалась примерно в 7100 особей в дикой природе; он занесен в Красную книгу МСОП как уязвимый вид.

Во-вторых, в процессе эволюции гепард приобрел ряд интересных морфологических и физиологических особенностей, связанных с его необычным образом жизни и уникальным способом охоты: это стремительный хищник, который охотится за добычей, догоняя ее на скоростях, превышающих 100 км/ч. Особенности морфологии гепарда является строение когтей, которые не втягиваются до конца в процессе бега, помогая животному цепляться за почву и резко менять направление движения. Процесс охоты оказывает серьезное влияние на физиологическое состояние гепарда, особенно на частоту дыхания, артериальное давление и регуляцию температуры тела. Развитие резких физиологических изменений организма, которые происходят в течение нескольких секунд, представляют большой интерес при изучении стресса у животных.

В-третьих, популяционная история гепардов имеет ряд специфических особенностей: предполагается, что в процессе эволюции их популяция могла несколько раз проходить через бутылочное горлышко по численности особей, что привело в итоге к чрезвычайно низкому уровню генетического разнообразия этих животных. По сравнению с человеком уровень разнообразия гепардов снижен на 90-99%. В результате инбридинга, животные оказываются восприимчивыми к вирусным заболеваниям, имеют высокую смертность потомства.

Таким образом, низкий уровень генетического разнообразия гепардов, нарушение морфологии сперматозоидов, повышенная восприимчивость животных к летальным вирусным

инфекциям предоставляют уникальный материал для детального анализа рисков и последствий низкого генетического разнообразия методами секвенирования следующего поколения на уровне полного генома.

В силу указанных факторов, изучение полного генома гепарда, его генетического разнообразия, адаптационных механизмов и демографической истории является весьма актуальной задачей как с прикладной точки зрения (поддержание разнообразия популяции гепардов, изучение ответа организма на стресс), так и с фундаментальной (механизмы эволюции популяций с высоким уровнем инбридинга).

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе впервые проведена сборка полного генома африканского гепарда *Acinonyx jubatus* и его подробная аннотация, включая предсказание генов, повторов и мобильных генетических элементов. Собранный геном гепарда представляет собой первый публично доступный геном вида, относящегося к линии *Puma*. Сборка проведена на основе комбинации парных прочтений с короткими и длинными вставками. Соискателем был разработан новый метод сборки на основе использования референсного генома. Этот подход позволил получить более высокое качество сборки по сравнению с другими методами. Качество сборки генома позволяет оценить состав генов и структурные перестройки генома.

Собранный геном гепарда позволил впервые проанализировать структуру его генома, включая предсказанные методами биоинформатики гены, состав мобильных элементов и tandemных повторов. Проведены на детальном уровне ряд важных исследований в области геномики и молекулярной эволюции этого вида.

Впервые на геномном уровне продемонстрирован низкий уровень генетического разнообразия популяции гепардов. Полученные данные позволили провести реконструкцию демографической истории вида. Механизмы резкого снижения генетического разнообразия обоснованы в рамках модели, согласно которой предковая популяция гепардов, начиная с ~ 100 000 лет до разделения на две субпопуляции растет в размере, после разделения следует эффект бутылочного горлышка, который две субпопуляции переживают независимо.

Автор впервые реконструировал локусы МНС у гепарда и провел их сравнение с аналогичными локусами в геномах других животных и у человека. На геномных данных подтверждена гипотеза о низком разнообразии этих локусов в популяции гепардов, отсутствии ряда генов этого локуса, в сравнении с другими организмами. Полученный результат согласуется с наблюдениями о приживаемости кожных трансплантатов между неродственными особями и восприимчивостью животных и их высокой смертности от вирусных инфекций.

Геномные данные позволили проанализировать спектр однонуклеотидных полиморфизмов в масштабе всего генома и выявить гены, которые подвергались накоплению повреждающих мутаций. Анализ генных онтологий и функциональных доменов позволил впервые связать эти мутации с функцией генов в организме животных. На основе такого анализа показана аномально высокая доля накопленных повреждающих гомозиготных мутаций в кодирующей части гена *AKAP4*, который экспрессируется исключительно в семенниках и формирует важный компонент жгутика сперматозоида. Таким образом, полученные данные позволяют связать повышенную тератозооспермию, обнаруженную у гепардов-самцов с молекулярной структурой генов в геноме гепарда.

В результате аннотации и поиска генов в геноме, анализа режимов их эволюции, были описаны ранее неизвестные молекулярные механизмы адаптации к высокоскоростному бегу и плотоядному типу питания. Следы положительного отбора, экспансия некоторых генных семейств, а также структурные вариации были обнаружены в генах, отвечающих за регуляцию сокращения сердечной и поперечнополосатой мускулатуры, тепловой стресс и регуляцию катаболических

процессов. Все это впервые на геномном уровне демонстрирует генетические основы уникальных адаптаций гепардов к хищническому образу жизни и специфическому стилю охоты.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

В своей работе авторы используют хорошо зарекомендовавшие себя биоинформатические методы, надежность которых многократно была продемонстрирована ранее в других исследованиях. При проверке статистических гипотез авторы используют надлежащие статистические тесты, что обеспечивает достоверность полученных результатов.

Качество сборки геномов подтверждается как прямой оценкой ключевых статистик (N50, L50, покрытие и др.), так и дополнительными тестами, сравнением с геномами домашней кошки и рядом других млекопитающих, анализом GC состава собранных скаффолдов, рядом тестов, характеризующих качество и полноту аннотации белок-кодирующих генов. По совокупности проведенных тестов высокое качество сборки генома гепарда не вызывает сомнений.

При оценке связи функций генов и характера мутационных событий в них использованы необходимые пороги достоверности для проверки гипотез, учтена поправка на множественное сравнение.

При оценке сценариев эволюции популяции гепардов использовался метод максимального правдоподобия и оценены доверительные интервалы параметров модели.

Таким образом, с точки зрения обоснованности и достоверности полученных результатов, сделанных на их основе выводов и положений работа соискателя не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Материалы и результаты работы изложены последовательно и аргументировано. Диссертация построена по традиционному плану и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 110 страницах и содержит 26 рисунков и 20 таблиц. Список литературы содержит 135 библиографических ссылок. Диссертационная работа, как и автореферат, оформлены в соответствии с установленными требованиями. Автореферат в необходимой и достаточной степени отражает результаты диссертационной работы.

В литературном обзоре описаны современные представления о филогенетике клады Puma, представлены два предполагаемых главных сценария происхождения рода *Acinonyx*. Представлена информация о снижении численности популяций и генетического разнообразия африканских гепардов в 19-20 веках, описан ряд результатов по оценке генетического разнообразия, полученных учеными за последние 50 лет. Обзор содержит информацию об основных этапах геномного проекта и методах работы с геномными данными.

В главе 2 «Материалы и методы» описаны биоинформатические методы анализа геномных данных, в том числе принципы работы программы Chromosomerg, а также методы исследования молекулярной эволюции и эволюции популяций на основе данных о полиморфизмах.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» детально описаны процедуры формирования и секвенирования геномных библиотек, их биоинформатической обработки, сборки генома и всесторонней оценки ее качества. Описаны результаты поиска генов в геномной последовательности гепарда, мобильных элементов, идентификации сигналов движущего Дарвиновского отбора, анализа дубликаций и потерь генов, их связи с физиологическими особенностями гепардов. Представлены результаты изучения генетического разнообразия

популяции гепардов и сравнение с данными по другим организмам, анализ вариаций в локусах МНС, изучения популяционной истории гепардов и выбор моделей их эволюции.

Заключение резюмирует итоги работы.

Текст работы полностью соответствует поставленным целям исследования. Таким образом, поставленные цели и задачи выполнены в полном объеме, что позволяет говорить о завершенности представленной диссертационной работы. Положения, выносимые на защиту, и выводы являются обоснованными и аргументированными.

Замечания по содержанию диссертации

Несмотря на общую высокую оценку диссертационной работы, к работе есть ряд замечаний, в основном редакционного характера:

1. На стр. 38 в разделе «2.13 Поиск сигналов позитивного отбора» указаны две модели эволюции A1 и A, суть которых в достаточной степени не изложена.
2. На стр. 42 приводятся четыре популяционные модели, однако они не обоснованы привязкой к каким-либо существующим представлениям об эволюции популяции гепардов. Т.е. не вполне понятен их биологический смысл и связь с современными представлениями об эволюции этого вида.
3. В Таблице 4 на стр. 44 не указаны к каким образцам относятся статистики по прочтениям полногеномных библиотек (как, например, это сделано в таблице 14).
4. Рисунок 5 на стр. 51: подпись не соответствует содержанию рисунка.
5. Рисунок 7 на стр. 54: ошибка в подписи к осям панелей А и Б. В исходной статье масштаб осей указан как 10^7 , в диссертации создается впечатление, что масштаб по оси X такой же как на панелях В,Г, так что рассуждения в тексте противоречат информации на рисунке.
6. Рисунок 24 на стр. 84: не указано в каком направлении отсчитывается время (по-видимому лет назад от современной даты?).
7. Рисунок 25 на стр. 87: нет подписи к оси X.
8. В тексте также присутствуют опечатки и неточные употребления слов. В частности, в выводе 2 упоминается о высокой смертности гепардов от коронавирусной инфекции (вероятно имелось ввиду от вирусных инфекций вообще).

Эти недостатки, однако, не снижают высокий уровень представленной работы и основных научных положений и выводов диссертации.

Подтверждение опубликования полученных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертационной работы опубликовано семь статей в рецензируемых научных журналах, входящие в основные библиометрические базы данных (РИНЦ, WoS и Scopus). Первым автором соискатель является в одной из этих публикаций. Опубликованные по теме диссертации работы в достаточной степени отражают ее основные положения. Также основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на международных и российских научных конференциях.

Заключение

Диссертационная работа Добрынина П.В. является законченной и выполнена соискателем на высоком научном уровне. Представленные в работе исследования достоверны, использованные методы и результаты хорошо описаны, обсуждена значимость полученных результатов и их связь с современным представлением об эволюции гепардов. Выводы и заключения обоснованы.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости представленных результатов, диссертационная работа Добрынина П.В. «Сборка и аннотация генома африканского гепарда, *Acinonyx jubatus*» соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Отзыв был заслушан и утвержден на семинаре Лаборатории эволюционной биоинформатики и теоретической генетики «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» 29 августа 2022 года.

И.о. зав. лабораторией эволюционной
биоинформатики и теоретической генетики
«ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»,
к.б.н., доцент
(e-mail ada@bionet.nsc.ru)

Афонников Д.А.

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, к.б.н.



Орлова Г.В.