

ОТЗЫВ

официального оппонента Холодовой Марины Владимировны

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Добрынина Павла Владимировича

**«СБОРКА И АННОТАЦИЯ ГЕНОМА АФРИКАНСКОГО ГЕПАРДА,
ACINONYX JUBATUS» по специальности 1.5.7 – Генетика**

Актуальность темы диссертации П.В. Добрынина не вызывает сомнения ни в отношении выбора объекта исследования, ни по научной значимости решаемой проблемы. Гепард (*Acinonyx jubatus*) – уникальный вид сем. Кошачьих, находящийся под угрозой исчезновения, включенный во все Красные книги мира. Длительная история снижения численности привела к утрате генетического разнообразия и возникновению признаков инбредной депрессии у зоопарковских и диких гепардов. Генетическое разнообразие гепардов ранее исследовали разными методами с применением различных молекулярных маркеров. В работе Добрынина Павла Владимировича для этого впервые использован метод анализа полного генома африканского гепарда, включающий сборку генома и интерпретацию полученных данных с точки зрения потенциальной адаптивности вида и его жизнеспособности. В целом, в диссертации П.В. Добрынина полноценно защищаются как методические разработки, так и результаты генетических особенностей гепарда. Работа выполнена с использованием современных методов генетики и биоинформатики.

Работа П.В. Добрынина отличается **высокой степенью научной новизны**. Впервые был собран и аннотирован геном африканского гепарда. Впервые был разработан новый оригинальный метод сборки с применением референсного генома, дающий более точные результаты по сравнению с другими методами. Для гепарда были описаны ранее неизвестные генетические адаптации,

обеспечивающие максимальную для млекопитающих скорость бега. Впервые на основании анализа полного генома для африканского гепарда были получены объективные данные о существенной утрате разнообразия в самых разных частях генома, включая функционально значимые гены и генные комплексы, объясняющие пониженный уровень размножения и низкую устойчивость к инфекционным болезням современных гепардов. Впервые по результатам полногеномного анализа предложен сценарий популяционной истории африканского гепарда.

Несомненна **теоретическая и практическая значимость** работы. Полученные результаты имеют прямое отношение к таким фундаментальным направлениям современной биологии и генетики как сохранение биоразнообразия, эволюция генома. Результаты исследования П.В. Добрынина расширяют знания в области природоохранной биологии, позволяют на генетическом уровне оценить влияние периодов резкого и длительного снижения численности на важнейшие показатели жизнеспособности животных – репродуктивные качества, устойчивость к болезням. Результаты работы П.В. Добрынина имеют большое практическое значение для развития методов анализа полногеномных данных, для формирования программ по сохранению гепарда, а также представителей сем. Felidae и других видов млекопитающих, находящихся на грани исчезновения. Разработанная автором вместе с другими учеными программа Chromosomer, позволяющая создавать первичную сборку скаффолдов хромосомного уровня на основе карты выровненных фрагментов целевого и референсного геномов, может быть использована в аналогичных исследованиях других видов. Большую практическую ценность для дальнейшего изучения гепардов из разных частей ареала имеют описанные автором вредные мутации в гене *AKAP4*, ассоциированного со сперматогенезом, и разработка праймеров для амплификации локуса с данными мутациями. Оригинальные данные по структуре генома гепарда, размещенные в международных генетических базах в открытом доступе (NCBI GenBank, GARFIELD (<http://garfield.dobzhanskycenter.org/>)), безусловно, будут использоваться многими исследователями.

Рукопись диссертации изложена на 110 страницах, включает введение, три главы - «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключение, выводы, список литературы (135 источников, все на английском языке), содержит 26 рисунков и 20 таблиц, список сокращений.

Во введении приводятся все необходимые разделы: актуальность исследования, степень разработанности темы исследования, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, оценка личного вклада автора в проведенные исследования и благодарности.

Глава 1 «Обзор литературы» состоит из четырех разделов. В первых двух дается краткий обзор публикаций о филогенетике и естественной истории гепардов, а также о снижении численности популяций и генетическом разнообразии африканских гепардов в 19-20 вв. Очень хорошее впечатление производят два других раздела главы, посвященные обзору публикаций по методологии и методам работы с геномными данными. В них рассматриваются методы получения сборки хромосомного уровня на основе референса, поиска повторов, аннотации генов, а также методам реконструкции демографической истории видов, полученных по результатам полногеномного анализа. В целом обзор литературы, особенно посвященный методическим основам анализа полногеномных данных, отражает широкую эрудицию автора в проблемах, имеющих непосредственное отношение к теме диссертации.

В главе 2 «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ» приводится подробное описание использованных образцов - крови семи неродственных особей африканских гепардов из Намибии ($n = 4$) и Танзании ($n = 3$), методов выделения ДНК, создания библиотек и полногеномного секвенирования. Кроме того приводится широкий спектр использованных инструментов биоинформатики, методов оценки качества прочтений, поиска и аннотации SNV, способов оценки генетического разнообразия. Приводится описание дополнительно использованных геномных

данных и процесс De novo сборки генома африканского гепарда, сборки на основе референса, а также оценки качества сборки генома. Охарактеризованы методы поиска блоков синтении, идентификации повторов, аннотации генов, поиска сигналов позитивного отбора, анализа генных семейств, генов связанных с размножением, состава генов и генетического разнообразия для района МНС. В конце данной главы приводится описание методов реконструкции демографической истории вида. Все методы описаны четко. Отличное впечатление производит подробное перечисление всех многочисленных баз данных (GenBank, RefSeq и др.) и программ (более 30!), использованных автором в работе.

Эта глава отражает высокий профессиональный уровень автора и огромный объем работы, выполненный П.В. Добрыниным при проведении данного исследования.

Основная часть диссертации представлена в главе 3 «РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ». Глава включает четыре больших раздела. В каждом из разделов подробно описаны полученные результаты и приводится их обсуждение. Для данной работы такая структура представляется вполне логичной, поскольку каждый из разделов представляет собой отдельный самостоятельный этап исследования. Все полученные результаты и способы их верификации описаны четко и подробно, к обсуждению привлекаются важнейшие публикации по данной тематике. Отмечу, что в качестве референсного генома в большинстве случаев автор использует геном домашней кошки, в аннотации которого П.В. Добрынин принимал непосредственное участие. Это очень удачно, поскольку по современной систематике сем. Кошачьих гепарда относят именно к подсемейству малых кошек (*Felinae*). При этом в ряде случаев сравнение проводится для двух экземпляров домашней кошки, отличающихся по уровню инбридности.

В первом разделе дается оценка полученных данных секвенирования и сборки генома африканского гепарда. В нем приводятся результаты анализа данных

секвенирования африканского гепарда для референса-образца – самца из Намибии, и шести дополнительных особей гепарда. Отмечу, что для получения данных высокого качества из объема первичных прочтений автор применял ряд фильтров для отсева дубликатов ПЦР, химерных последовательностей и прочтений с высоким уровнем ошибок. *De novo* сборка позволила получить геном африканского гепарда объемом 2,38 млрд.п.н. Большой интерес представляет подраздел, посвященный сборке генома африканского гепарда на основе референса домашней кошки, для чего была специально разработано открытое кроссплатформенное программное обеспечение – Chromosomer. Высокой оценки, свидетельствующей о профессиональной зрелости соискателя, заслуживает заключительная часть данного раздела, в которой приводится подробное описание результатов оценки качества полученной геномной сборки и их обсуждение. Проводится сравнение полученных данных с геномами домашней кошки, амурского тигра, дальневосточного леопарда, льва, домашней собаки. Подробный и четкий анализ полученных результатов, аргументировано доказывает высокое качество *de novo* геномной сборки африканского гепарда. Этот раздел может служить примером вдумчивого и добросовестного отношения к анализу и трактовки полученных результатов описания полных геномов.

Второй раздел главы логично продолжает анализ генома африканского гепарда на следующем уровне. Он посвящен результатам анализа генов и повторов в геноме гепарда. В нем приводятся данные по идентификации повторов и генов в геноме африканского гепарда, поиску сигналов положительного отбора, анализу экспансии и сокращения генных семейств и анализу генов, связанных с размножением. Получены чрезвычайно интересные результаты. Например, среди 947 генов гепарда с признаками положительного отбора П.В. Добрынину удалось выявить группы генов, связанных с регуляцией сокращения сердечной и поперечнополосатой мускулатуры, что позволяет объяснить характерные черты гепарда, как наиболее скоростного хищника. Анализируя экспансию и сокращения генных семейств у гепарда, наряду с другими представителями сем. Кошачьих, было установлено двукратное по сравнению с другими

млекопитающими увеличение числа генов, кодирующих ферменты анаэробного метаболического пути. Автор справедливо связывает это с хищническим образом жизни. Очень важные для понимания популяционной генетики и экологии современных гепардов стали результаты повышенных значений kA/kS , отражающих высокую долю несинонимичных замен в генах, связанных с размножением. Например, было установлено, что 18 генов гепарда, связанных со сперматогенезом и оогенезом, содержали мутации, ассоциированные с азооспермией, олигоспермией и дисфункцией гонад. Особенно ускоренное накопление потенциально вредных мутаций обнаружено в гене *AKAP4*, связанного со сперматогенезом. Эти данные объясняют высокую, более 80 %, долю дефектных сперматозоидов у гепардов, низкий уровень воспроизводства в природных и зоопарковских популяциях.

В третьем разделе главы рассматриваются данные по изучению генетического разнообразия в свободноживущих популяциях африканского гепарда. На основании описания распределения по геному и плотности встречаемости единичных нуклеотидных замен (всего 3,44 млн.), обозначаемых автором как SNV, была установлена значительная утрата генетического разнообразия по сравнению с другими видами млекопитающих, для которых имеются сопоставимые данные. Так частота встречаемости SNV у гепарда была на 90% меньше, чем у домашнего беспородного кота.

Плотность SNV гепарда оказалась в 8-15 раз ниже, чем у человека, домашнего и европейского дикого кота и сопоставима лишь с таковой у львов из изолированной крайне малочисленной азиатской популяции. Отмечен критически низкий уровень гетерозиготности (0,021%) по сравнению с домашней кошкой (15%), тигром (50-61%). Кодрующие гены гепарда обнаружили 50-кратное сокращение генетического разнообразия по сравнению с таковым у домашней и дикой европейской кошки. П.В. Добрынин отмечает, что полные митохондриальные геномы гепарда также демонстрируют значительное (в среднем на 90%) снижение количества SNV по сравнению с другими видами.

Очень интересные, биологически значимые результаты были получены П.В. Добрыниным при сборке на референсную последовательность для генного комплекса гистосовместимости (МНС), ассоциированного с иммунным ответом организма, а также с другими физиологическими функциями. Автор показал не только существенное снижение аллельного разнообразия, но и утрату ряда генов МНС по сравнению с другими видами. Сравнение числа SNV в генах МНС гепарда из Намибии и Танзании с данными по беспородной домашней и дикой кошки, человека и собаки показало 95-98% -ное снижение SNV разнообразия в обеих популяциях гепардов. Оно было сопоставимо только с данными для высокоинбредного кота абиссинской породы. П.В. Добрынин справедливо связывает высокую смертность гепардов от коронавирусной инфекции со значительной утратой варибельности МНС. Генетическая мономорфность гепарда позволила объяснить уникальное свойство вида – отсутствие эффекта отторжения тканей при пересадке неродственным особям.

В заключительном разделе главы приводятся результаты использования данных полногеномного секвенирования для изучения популяционной истории африканского гепарда. В главе 2 подробно описаны методы и подходы для такого рода исследований. Для оценки демографической истории гепарда автором были сформулированы и с использованием модели диффузной аппроксимации и спектров частот аллелей (SFS) проверены четыре сценария в демографической истории африканского гепарда. Наиболее вероятным был признан сценарий, свидетельствующий о том, что предковая популяция, в период примерно до 100 тыс. лет назад до разделения на две субпопуляции (южную и восточную) растет в размере, после разделения следует эффект бутылочного горлышка, который обе субпопуляции переживали независимо. Результаты моделирования DaDi предполагают наличие эффекта основателя у гепардов уже в период около 100 тыс. лет назад. П.В. Добрынин пытается дать возможные объяснения полученным данным о снижении численности предковой популяции гепардов около 100 тыс. лет назад, рассматривая две гипотезы происхождения африканских гепардов, с

соответственно разными центрами – американским и азиатским. Очевидно, дальнейшие данные по палеонтологии и изучения древней ДНК позволят более точно ответить на вопрос о центре происхождения р. *Acinonyx*. Разделение на южную и восточную группировки африканского гепарда автором датируется периодом конца плейстоцена – начала голоцена.

В заключении суммируются полученные результаты и их интерпретация.

Диссертационная работа П.А. Добрынина производит очень хорошее впечатление. Результаты соответствуют поставленным цели и задачам, выводы и положения, выносимые на защиту, отражают важнейшие результаты работы и соответствуют поставленным задачам. Рукопись оформлена в соответствии с правилами оформления кандидатских диссертаций, хорошо иллюстрирована. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации. Все основные результаты диссертации опубликованы в семи статьях в высокорейтинговых научных журналах, включенных в список ВАК, а также были представлены на трех международных конференциях и нескольких семинарах. Проведенное исследование выполнено на самом высоком современном уровне. В целом по своему содержанию данная работа соответствует кандидатской диссертации высокого уровня. Работа по изучению генома гепарда очень перспективна. Полученные результаты и использованные методы могут быть применены в дальнейших исследованиях, основанных на анализе исторических и древних образцов африканского и азиатского гепардов.

Однако к тексту рукописи есть несколько замечаний и вопросов.

1. В рукописи встречаются опечатки, не выверенные фразы. Например, во введении (с.5) автор пишет «Одним из приспособлений гепарда к выживанию являются морфо-функциональные особенности строения ногтей, рассчитанные на быстрое передвижение». Там же (с.6) латинское название африканских буйволов вместо *Syncerus caffer*, почему-то заменено английским названием (*Cape buffalo*).

2. В первом разделе Обзора литературы (с.17) вместо ссылки стоит [ref].
3. При описании материалов (с.27) указано, что анализировали образцы гепардов, относящихся к двум подвидам – «*Acinonyx jubatus jubatus* и *A. j. raineyii*, соответственно». Эти латинские названия являются синонимами одного подвида – южноафриканского гепарда (или гепарда Юго-Восточной Африки) – *A. jubatus jubatus* (См. CATnews Special Issue 11, 2017). В Намибии и Танзании обитают две популяции этого подвида – южная и восточная.
4. В главе 2 (С.29-30) два разных раздела «методы оценки качества прочтений» и «методы поиска и аннотации SNV» имеют один и тот же номер 2.4.
5. В таблице 20 (с. 89) Значения параметров для демографических событий...– для каждого параметра следовало бы указать, какие значения рассматриваются – число особей, лет и т.д.
6. На с. 75 автор пишет «Полные митохондриальные геномы гепарда аналогичным образом показывают снижение количества SNV по отношению к другим видам в среднем на 90% (Табл. 16)». Однако в таблице 16 «Генетическое разнообразие (Pi) в митохондриальном геноме гепарда в сравнении с восемью другими млекопитающими» значение Pi (это нуклеотидное разнообразие?) варьирует в широких пределах. Просьба объяснить, что в табл. 16 указывает на снижение количества SNV у гепарда по сравнению с другими видами?
7. Список сокращений (с. 95) составлен крайне небрежно. Часть расшифровок дана на русском, остальные только на английском языке. При этом SNV расшифровывается как «Single nucleotide polymorphism», что соответствует общепринятому обозначению SNP (однонуклеотидный полиморфизм).

Отмечаю, что высказанные замечания в основном относятся к редакционным недочетам и не влияют на высокую оценку диссертации П.В. Добрынина.

По актуальности, научной новизне, объему и качеству выполненных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертация П.А. Добрынина «СБОРКА И АННОТАЦИЯ ГЕНОМА

АФРИКАНСКОГО ГЕПАРДА, *ACINONYX JUBATUS*» является завершенным научным исследованием, полностью соответствует п.п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, ред. от 01.10.2018 № 1168, ред. от 20.03.2021 № 426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Павел Владимирович Добрынин, безусловно, заслуживает присуждения ему искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Главный научный сотрудник, руководитель Кабинета методов молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН), доктор биологических наук

Марина Владимировна Холодова

Москва 119071 Ленинский проспект, 33, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН), mvkholod@mail.ru Тел/Факс 495 952 77 97/495 954 55 34

Подпись М.В. Холодовой заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН)

Доктор биологических наук



Н.Ю. Феокистова

13 сентября 2022 г.