

## ОТЗЫВ

официального оппонента  
на диссертацию Клепиковой Анны Владимировны, представленную на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Создание и анализ  
экспрессионных карт *Arabidopsis thaliana* и *Capsella bursa-pastoris*», по  
специальностям 03.02.07 – «Генетика» и 03.01.09 – «Математическая биология,  
биоинформатика»

### Актуальность темы диссертационной работы

Механизмы контроля живых организмов как для поддержания гомеостаза в нормальных условиях жизнедеятельности, так и при действии различных стрессовых факторов является предметом исследования во многих странах. Такой контроль осуществляется на нескольких уровнях: организации хроматина, транскрипции, процессинга и сплайсинга пре-мРНК, трансляции, стабильности белкового продукта и модификации белков.

Современные экспериментальные оптические инструменты геномного мониторинга экспрессии генов растений позволяют проследить за потоком генетической информации от генома до протеома и метаболома. Применение новых экспериментальных подходов, таких, например, как ДНК-микрочипы и RNA-Seq, прояснили многие ключевые механизмы регуляции транскрипции растений, как первого этапа экспрессии генов, и наиболее лёгкого в методическом плане для экспериментального исполнения. Исследования транскриптомов, т.е. качественной и количественной оценки профиля экспрессии всего пула генов на уровне генома, позволили получить убедительные доказательства динамического изменения транскриптомов, как в процессах роста и развития, так и при действии разнообразных факторов окружающей среды у разных видов растений.

Несмотря на большое количество транскриптомных данных, полученных для различных видов растений, включая и модельное растение *A. thaliana*, около 30% растительных генов до сих пор не имеют даже аннотации или их описания слабо детализированы. Это обусловлено как низкой чувствительностью методов, которые использовались при получении данных для создания классификации, так и с малым разнообразием биологических образцов, используемых, например, при создании атлас экспрессии модельного растительного объекта. И этот факт вносит существенные ограничения для функциональной аннотации генов других видов растений, для которых проведение долгосрочных комплексных исследований затруднено или невозможно, или для изучения таких явлений, как ранние стадии субфункционализации генов после процессов полиплоидизации. поскольку паттерн транскрипции может опосредованно свидетельствовать о функции генов аннотированные и паттерны транскрипции модельного объекта служат основной для

такой аннотации. Это делает актуальным создание транскриптомной карты такого модельного растения как *A. thaliana* с использованием максимально доступных методов анализа, а также расширение спектра анализируемых образцов.

Такие исследования важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической. Диссертационная работа Клепиковой Анны Владимировны посвящена созданию транскриптомных карт модельного объекта генетики растений *A.thaliana* и близкого к нему аллотетраплоида *Capsella bursa-pastoris*, а также оценки возможностей использования полученных данных для анализа биологических процессов. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, описания материалов и методов исследования, выводов, списка цитируемой литературы и приложений.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, представлены результаты проведенных исследований в четырех главах, каждый из которых содержит введение, обзор литературы, результаты, обсуждение и заключение. Такое представление полученных результатов, в данном случае, вполне оправдано, поскольку отражает общую логику проведенных исследований – от создания транскриптомной карты модельного растения *A.thaliana*, через оценку возможностей использования транскриптомной карты для анализа биологических процессов, таких как временной серии апикальных меристем при переходе к цветению и органоспецифического ответа на холодовой стресс, и разработку транскриптомной карты *C. bursa-pastoris* для с последующей оценкой потенциального геномного доминирования транскрипции гомеологичных генов и возникновения новых сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторах гомеологов.

Обзор литературы каждой из глав охватывает широкий круг вопросов, а именно: (1) в первой главе дается краткое описание истории создания первых транскриптомных карт, их технические характеристики, степень детализации и охват для различных видов растений, а также использование транскриптомных карт для общего описания транскриптомов, поиска стабильно транскрибируемых генов, анализа тканеспецифичной транскрипции генов, детального изучения транскрипционных факторов и рассматривают проблемы и ограничения уже созданных транскриптомных карт растений; (2) во второй главе сосредоточены литературные данные о фотопериодической регуляции зацветания и кратко затрагиваются другие способы его инициации, а также степень изученности

глобальных изменений транскриптома апикальной меристемы при переходе к цветению; (3) в третьей главе представлены современные данные о механизмах восприятия пониженной температуры, путей передачи сигнала и транскрипционной регуляции ответа растений на низкие температуры, в частности вопросу функционирования известного регулона генов *CBF* растений; (4) в 4 главе представлены сведения о полиплоидизации как основном пути эволюции растительных геномов, и ее последствия для транскриптомов растений. В заключении обзора литературы для каждой главы Анной Владимировной, на основе проведенного анализа научной литературы, по тематике работы, определены основные пути для решения поставленных научных задач в этой области исследований.

В целом обзор литературы написан хорошим языком и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Весьма отраднo, что Анна Владимировна при написании литературного обзора, использует не только научные результаты зарубежных коллег, но и хорошо знает и цитирует научные публикации российских исследователей. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Аналитическое рассмотрение данных, представленных в разделах "Результаты" и "Обсуждение", позволяет заключить следующее: соискателем была предпринята серия экспериментов, в целом, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи.

Прежде всего, хотелось подчеркнуть, что проведенные Анной Владимировной исследования базируются на литературных данных, а также результатах, полученных в организации ранее, и сформулированных на основании этого целей и задачах исследования.

Первый раздел посвящен созданию и анализу транскриптомной карты *A. thaliana*. Для этого проведена большая серия экспериментов по получению и секвенированию биологических образцов 79 временных серий, полученных из: листьев, меристем, цветков и семена модельных растений. В результате анализа полученных данных Анной Владимировной отмечено, что в созданной транскриптомной карте выявлена транскрипция 5 877 генов, которых не представлено в первом транскриптом атласе *A. thaliana*. Таким образом, убедительно продемонстрировано, что в наборе изучаемых образцов детектируются транскрипты более 99% генов, потенциально способных транскрибировать вне зависимости от внешних условий. Результаты дальнейшего анализа транскриптомных данных о стабильности и тканевой специфичности транскрипции генов, а также оценки

транскрипции семейства транскрипционных факторов позволили соискателю: (1) подтвердить, что только небольшая часть (1,8%) генов обладает узким паттерном транскрипции, указывая на их вероятное участие в определении тканевой специфичности, тогда как большая часть генов транскрибируется во всех или большинстве тканей растения; (2) продемонстрировать, что гены, обладающие равномерной транскрипцией во всех образцах, участвуют в разных биологических процессах, но чаще связаны с функционированием мембран; (3) выяснить, что различные семейства транскрипционных факторов обладают разным уровнем тканевой специфичности: для семейств ряда семейств характерны более узкие паттерны транскрипции, тогда как другие присутствуют во всех или в большинстве органах и тканях *A. thaliana*. При этом следует отметить, что для оценки разнообразия уровня транскрипции генов в транскриптомной карте, соискатель использовал меру «ДЭ-значение гена», а именно, число парных сравнений, в которых данный ген являлся дифференциально транскрибируемым, а для определения ширины паттерна транскрипции гена - энтропию Шеннона. Заключительным этапом этой части исследований стала создание публично доступной базы данных **Transcriptome Variation Analysis (TraVA, travadb.org)**, в котором размещена транскриптомная карта *A. thaliana* с самым высокоразрешенным набором транскриптомных данных.

Вторая часть диссертационной работы связана со сбором, анализом и подробным рассмотрением временной серии апикальных меристем, которая покрывала процесс перехода к цветению с разрешением в один день (серии M1-M10) и собрана в условиях длинного дня, индуктивных для зацветания *A. thaliana*. На основе транскриптомных данных Анной Владимировной оценено число транскрибируемых генов в каждом образце и относительный уровень транскрипции ключевых генов, регулирующих переход к цветению: гена *LFY*, экспрессия которого возрастает в процессе перехода, и гена *FLC*, инактивирующийся при зацветании. Анализ продемонстрировал, что профили транскрипции генов *LFY* и *FLC* соответствуют ожидаемому, что свидетельствует об адекватности собранной временной серии. Последующий кластерный анализ генов позволил выделить группы генов, экспрессия которых согласованно изменяется в этот временной период; большинство из них оказались связанными с регуляцией клеточного цикла, причем на одиннадцатый день после прорастания (стадия M5 временной серии) увеличивается экспрессия как генов, ассоциированных с S-фазой, так и генов, участвующих в митозе. На основании детального анализа профилей транскрипции отдельных групп генов предложена гипотеза, которая может объяснить изменения, выявленные в момент перехода к цветению в апикальной меристеме побега *A. thaliana*: первоначально

происходит критическое изменение динамики клеточных делений, которое, вероятно, связано с сокращением длительности клеточного цикла за счет фаз G1 и G2, далее, отмечается ускорение клеточного цикла, вероятно за счет реорганизации меристемы перед активацией гена *LFY*, а затем продолжительность клеточного цикла восстанавливается на прежнем уровне, а состояние апикальных меристем меняется из вегетативного в репродуктивное.

В третьей главе представлены результаты экспериментальных и теоретических исследований, связанных с изучением органоспецифического ответа на воздействие низких температур у растений *A. thaliana*. На основании транскриптомных данных Анна Владимировной проведен поиск общих и органоспецифических генов, транскрипция которых достоверно изменяется при воздействии низких положительных температур, с более детальной характеристикой уровня транскрипции генов, отвечающих на холодовое воздействие в значениях энтропии Шеннона и ДЭ-значений. Особо внимание уделено также анализу регуляторных элементов в промоторных областях у этого кластера генов. Проведенный анализ позволил выяснить, что основу ответа на положительные низкие температуры составляет небольшое число генов, дифференциально транскрибируемые во всех образцах, а именно те гены, которые входят в регулон транскрипционных факторов CBF. Вместе с этим, на основе полученных при анализе транскриптомных данных соискатель делает вполне обоснованный вывод, что развитие ответа на низкие положительные температуры у *A. thaliana* сочетает универсальные для всего растения процессы с тканеспецифичными; и в некоторых случаях тканеспецифичный ответ на такое воздействие происходит с помощью рекрутирования генов, которые в нормальных условиях отвечают за развитие других частей растения.

Поскольку диссертант убедительно продемонстрировала, что транскриптомные карты растений значительно расширяют возможности исследователя для детального анализа важных биологических процессов, таких как развитие апикальных меристем, ответные реакции растений на низкотемпературное воздействие, соискатель ставит перед собой еще одну важную задачу. Это задача – изучение таких явлений, как ранние стадии субфункционализации генов после процессов полиплоидизации,

В связи с этим вполне логичными видятся дальнейшие исследования Анны Владимировны по созданию транскриптомной карты *Capsella-bursa pastoris* – аллотерераплоидного вида, эволюционно и морфологически близкого к *A. thaliana* и использование ее для изучения процессов функциональной дивергенции гомеологов, их суб- и неофункционализацию, либо утрату функции.

Для решения этой задачи соискателем на основе анализа транскриптомных данных проведен детальный анализ дифференциальной транскрипции гомеологичных генов. Результаты проведенного сравнительного исследования позволил Анне Владимировне сделать следующие заключения: (1) об отсутствии геномного доминирования, то есть преимущественной транскрипции генов, принадлежащих одному из субгеномов; (2) о случайном характере инактивации одного гена из пары гомеологов на ранней стадии эволюции полиплоидов; (3) о субфункционализации и утрате функции гомеологов, происходящие равным образом в обоих субгеномах; (4) о том, что различия паттернов транскрипции гомеологичных генов могут возникать из-за возникновения сайтов посадки транскрипционных факторов у одного из гомеологов.

После глав, в которых представлены результаты и обсуждение полученных данных, приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем изложены основные методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал классических и современных методов, применяемых в мировой практике генетических и молекулярных исследований, анализа экспрессии генов, а также подходов к *in silico* анализу больших наборов биологических текстов и экспериментальных данных. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

#### **Степень новизны результатов научных исследований.**

Соискателем разработана транскриптомная карта *A. thaliana*, вошедшая в число самых крупных атласов экспрессии генов у растений, которая по серии транскриптомных данных позволяет исследовать тонкие механизмы биологических процессов. Так, соискателем на основе анализа входящих в ее состав временной серии апикальных меристем побега и впервые показаны согласованные изменения экспрессии генов, участвующих в прохождении клеточного цикла и вероятно связанные с изменением его длительности при переходе к цветению. Помимо этого, показана возможность использования транскриптомных данных для оценки универсальности развития реакции на холодовой стресс в разных органах *A. thaliana*, а именно, продемонстрирован органоспецифический ответ растений на действие пониженной температуры.

Приоритетными можно назвать и результаты по созданию транскриптомной карты *S. bursa-pastoris*, с помощью которой подтверждено отсутствие геномного доминирования на уровне экспрессии и показано, что различия в уровнях экспрессии

гомеологических генов связаны с возникновением новых сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторе одного из гомеологов.

### **Научная и практическая значимость результатов**

Диссертационная работа Анны Владимировны Клепиковой совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярных механизмах регуляции транскрипции генов и функционального анализа генов растений. С практической точки данная работа интересна тем, что транскриптомные карты *A. thaliana* и *C. bursa-pastoris* интегрированы в базу данных TraVA и используются как публичный ресурс, который уже используется в многочисленных исследованиях функций генов, проводимых другими научными группами, поскольку имеет такое важное преимущество как возможность анализа данных, полученных из множества транскриптомных экспериментов, что повышает достоверность предсказаний.

### **Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации**

Использование для исследований классических и современных биоинформатических, молекулярно-биологических и генетических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Анны Владимировны, а также выносимых на защиту положений и выводов.

### **Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Основные положения и результаты исследований по диссертации Анны Владимировны Клепиковой опубликованы в 5 статьях, которые опубликованы в престижных зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК). Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

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

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникло ряд вопросов:

1. Не ясно, какая освещенность была использована при выращивании растений *A. thaliana* и *C. bursa-pastoris*. Отметим, что у каждого растения особые требования к освещению для правильного развития. Как правило, при определении эффективности систем освещения этот параметр (освещенность) величина измерения выражается в микромоль- фотонах в секунду ( $\mu\text{mol/s}$ ) на единицу площади. Например,  $100 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$ .

2. На основании каких соображений или данных выбраны условия для воздействия низких температур -  $+4^{\circ}\text{C}$ , и время экспозиции 3 и 27 часов для экспериментов по оценки транскриптом в условиях холодового стресса? Были ли подобраны данные условия в ходе предварительных экспериментов? Или была проведена оценка физиологических и биохимических маркеров ответа растения на низкие температуры при выбранных условиях?

Это осталось в работе без пояснения или обсуждения.

По разделам диссертационной работе Анны Владимировны Клепиковой имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя.

Ко всем разделам диссертационной работы:

- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не вполне профессиональное использование некоторых терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы использовать обозначения: «холодовая акклимация» вместо «холодовая акклиматизация»; «экспозиция низкими положительными температурами» вместо «пониженные температуры» или «холодовой стресс» и т. д.

- частая подмена термина «транскрипция» на термин «экспрессия». Например, при описании в разделах «Анализ профилей экспрессии отдельных классов генов»б «Изменение экспрессии генов регулона CBF в различных органах», «Экспрессионные характеристики генов, отвечающих на холодовое воздействие» и т.д. Транскрипция – это безусловно важный этап экспрессии генов, и ее эффективность вносит значительный вклад, однако транскрипция не единственный биологический процесс, определяющий преобразование наследственной информации от гена в функциональный продукт, прежде всего белок. Экспериментально доказано, что регуляция экспрессии проходит и на уровне трансляции. В связи с чем общий термин «экспрессия» не следует подменять термином «транскрипция».

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить



правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация на тему «Создание и анализ экспрессионных карт *Arabidopsis thaliana* и *Capsella bursa-pastoris*» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а ее автор, Клепикова Анна Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.07 – «Генетика» и 03.01.09 – «Математическая биология, биоинформатика».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,

Руководитель лаборатории функциональной геномики

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева

Российской академии наук,



Голденкова-Павлова Ирина Васильевна

«06» ноября 2020 года

Контактные данные:

тел. +7 (499) 678-53-56; E-mail: [irengold58@gmail.com](mailto:irengold58@gmail.com); Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.07 – генетика

Адрес места работы:

127276 Российская Федерация, г. Москва, ул. Ботаническая, дом 35, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, группа функциональной геномики

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Ирины Васильевны Голденковой-Павловой удостоверяю:

Заместитель директора

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института физиологии растений им К.А. Тимирязева

Российской академии наук,

Нина Александровна Марченко

«06» ноября 2019 года

