

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Клепиковой Анны Владимировны «Создание и анализ экспрессионных карт *Arabidopsis thaliana* и *Capsella bursa-pastoris*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.07 – генетика, 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

Актуальность темы диссертации. В последнее десятилетие на фоне стремительного развития омиксных технологий открываются беспрецедентные перспективы системного исследования молекулярных процессов, лежащих в основе жизнедеятельности живых организмов. Одну из ведущих ролей в такого рода исследованиях играет транскриптомный анализ, который позволяет описывать и изучать функционирование генома в различных органах и тканях, на разных стадиях развития, в различных условиях окружающей среды. Более того, транскриптомные данные, обработанные и представленные в удобном для анализа виде в публично доступных базах данных, сами по себе становятся ценным инструментом, который может быть неоднократно использован для решения самых разнообразных задач. С этой точки зрения диссертация Анны Владимировны, посвященная разработке и использованию транскриптомных карт, является очень интересной и важной работой, значение которой как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте, безусловно.

Структура и содержание работы. Диссертация изложена на 179 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и одной таблицей. Диссертация состоит из девяти содержательных разделов («Введение», главы 1-4, «Материалы и методы», «Выводы», «Список литературы», «Приложения»), а также включает оглавление и список сокращений. В каждой из глав 1-4 выделены в качестве подразделов «Введение», «Обзор литературы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение». Список цитированной литературы включает 407 наименований.

Диссертация оформлена аккуратно, написано грамотно и понятно, читается интересно.

Во «Введении» аргументируется актуальность исследования, определяются цель и задачи диссертационной работы, а также методология, дается обоснование научной новизны, теоретической и практической значимости исследования, формулируются положения, выносимые на защиту.

Главы 1-4 выстраивают общую логику работы от создания детализированной транскриптомной карты *Arabidopsis thaliana* (глава 1), ее использования для исследования динамики экспрессии генов в меристеме при переходе к цветению (глава 2) и тканевой специфичности ответа на холодовой стресс у *A. thaliana* (глава 3) до планирования на ее основе и создания транскриптомной карты *Capsella bursa-pastoris* для анализа механизмов эволюции экспрессии гомеологичных генов (глава 4). Актуальность выполнения каждого

этапа работы обоснована в подразделе «Введение» соответствующей главы. Степень проработанности и изученности вопроса, исследуемого на каждом этапе, в публикациях других авторов освещается в подразделе «Обзор литературы». Так, Анной Владимировной проанализированы данные по 37 существующим транскриптомным картам растений и сформулированы общие принципы описания транскриптомов (глава 1), обобщены генетические механизмы инициации цветения (глава 2), рассмотрен феномен холодной акклиматизации и ее механизмы (глава 3), освещены вопросы эволюции транскриптомов после полиплоидизации (глава 4). Анализ литературных данных осуществлен Анной Владимировной подробно и квалифицированно. Хочется отметить удачный подбор материала для обзора и способ его подачи, которые в совокупности позволили очень четко позиционировать данную работу в предметной области, сохранив при этом компактность обзора, несмотря на широкий охват тематики.

Собственные результаты автора на каждом этапе описаны в подразделах «Результаты» соответствующих глав. Анна Владимировна провела детальную и кропотливую работу, по сбору образцов разных органов и тканей *A. thaliana* на разных стадиях развития (всего 79 образцов). Стоит отметить, что для синхронизации стадий развития собираемых растений (что является критичным, например, для временных серий) Анной Владимировной были разработаны специальные морфологические маркеры. Далее, на основании данных секвенирования транскриптомов собранных образцов ею была построена и охарактеризована транскриптомная карта *A. thaliana* с высокой степенью детализации. Использование технологии секвенирования РНК позволило получить транскриптомную карту более высокого разрешения по сравнению с существующей картой для *A. thaliana*, созданной ранее другой группой на базе микрочип-технологии (Schmid et al., 2005). Анной Владимировной описаны параметры входящих в состав новой карты транскриптомов, определены ткане- и органоспецифические гены, а также гены, стабильно экспрессирующиеся в разных органах и тканях, описаны гены, кодирующие транскрипционные факторы, с широким (MADS, LOB, LIM, MYB) и узким (SWI/SNF, SNF2, CAMTA, DDT, FAR) паттернами экспрессии (глава 1). Логичным развитием полученного результата является использование построенной и описанной карты для исследования конкретных биологических процессов. С целью исследования инициации цветения Анна Владимировна использовала временную серию меристем, входящую в состав карты. В соответствии с динамикой ключевых генов – регуляторов цветения и с учетом морфологических маркеров была определена стадия перехода, а также выявлены гены и биологические функции, которые согласованно активируются или подавляются на стадии перехода. На основании полученных результатов Анна Владимировна предложила интересную модель регуляции перехода к цветению в апикальной меристеме *A. thaliana* (глава 2). На следующем этапе на основании анализа транскриптомов образцов различных органов и тканей *A. thaliana*, подверженных воздействию пониженной температуры, Анне Владимировне удалось выявить и охарактеризовать универсальный (регулируемый транскрипционными факторами CBF) и тканеспецифические ответы растений на холод.

Этот результат подтверждает важность учета тканеспецифичности в исследованиях ответа растений на стрессы (Глава 3). В заключение, на основании 10 образцов наиболее транскрипционно различающихся органов и тканей, которые удалось выбрать на основании транскрипционной карты *A. thaliana* с высокой степенью детализации, Анна Владимировна построила транскриптомную карту аллотетраплоида *C. bursa-pastoris*. Анализ этой карты позволил показать отсутствие геномного доминирования и случайный характер инактивации одного гена из пары гомеологов на ранней стадии эволюции полиплоидов (глава 4). Основные результаты каждого этапа автор подробно обсуждает и резюмирует в подразделах «Обсуждение» и «Заключение» каждой главы, соответственно.

В разделе «Материалы и методы» определяется методическая база исследования.

В разделе «Выводы» конкретизированы выводы по каждой части работы.

Иллюстративные материалы диссертации наглядны и достаточно эффективно дополняют текст.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Благодаря подробному и квалифицированному анализу литературных данных, цель работы и задачи исследования представляются актуальными и научно обоснованными. Положения, выносимые на защиту, полностью отражены в материалах диссертации. Выводы диссертации опираются на изложенный материал, полностью соответствуют ему, обоснованы и являются достоверными. Большое комплексное исследование по созданию и анализу транскриптомных карт растений, выполненное Анной Владимировной, проведено на высоком научном и методическом уровне. Это позволило корректно решить поставленные задачи и достичь цель – создать транскриптомные карты модельного объекта генетики растений *Arabidopsis thaliana* и близкого к нему аллотетраплоида *Capsella bursa-pastoris*, а также оценить возможности использования полученных данных для анализа биологических процессов.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Степень научной новизны полученных автором результатов несомненно высока. При этом диссертационное исследование не только расширяет научные знания в области функциональной геномики растений, некоторые положения обладают существенной практической значимостью. Наибольшего внимания заслуживают следующие результаты диссертационной работы. (1) Впервые создана транскриптомная карта *A. thaliana* на базе технологии секвенирования транскриптома, которая вошла в число самых крупных атласов экспрессии генов у растений. Стоит подчеркнуть, что созданная на ее основе база Transcriptome Variation Analysis (TraVA) широко используется исследователями по всему миру. (2) Анализ транскриптомной карты *A. thaliana* позволил подробно охарактеризовать транскриптом растения, определить паттерны экспрессии генов, в том числе ранее не изучавшихся транскрипционных факторов, а также определить гены, стабильно экспрессирующиеся в разных органах и тканях. Последние могут быть использованы для корректной нормировки результатов анализа экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени, что наряду с активным использованием транскриптомной карты как

публичного ресурса свидетельствует о практическом потенциале полученных Анной Владимировной результатов. (3) Анализ входящей в состав транскриптомной карты *A. thaliana* временной серии апикальных меристем побега впервые показал согласованные изменения экспрессии генов, участвующих в прохождении клеточного цикла и вероятно связанные с изменением его длительности при переходе к цветению. (4) Наглядно продемонстрирован органоспецифический ответ растения на действие пониженной температуры. (5) Впервые получена транскриптомная карта *C. bursa-pastoris*, с помощью которой было подтверждено отсутствие геномного доминирования на уровне экспрессии и показано, что различия в уровнях экспрессии гомеологичных генов связаны с возникновением новых сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторе одного из гомеологов.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации. Текст автореферата в полной мере отражает содержание диссертации Клепиковой А.В. Автор имеет достаточное количество публикаций, в которых отражены основные результаты защищаемой работы.

Замечания по диссертационной работе:

1. Чем обосновывается использованный в работе подход для учета одновременного анализа 3081 парных сравнений? Строго говоря, использование в качестве аргумента для функции $p.adjust$ значений fdr (которые отражают долю ложноположительных результатов) вместо p -значений некорректно.

2. Из приведенного в главе 4 (раздел 4.3.5) описания неясно, на основании чего делалось заключение о связывании транскрипционных факторов при анализе промоторов гомеологичных генов у *C. bursa-pastoris*.

3. Содержание рисунка 3.4 противоречит тексту. На стр. 99 говорится: «Распределение энтропии генов, имеющих увеличенную экспрессию в образце Лист-3, обладает локальным пиком на низких (0-0,3) значениях энтропии (Рисунок 3.4 д)». Но на рисунке 3.4 д указанный локальный пик соответствует генам, не изменяющим экспрессию, согласно приведенной на рисунке цветовой кодировке.

4. В подписи к рисунку 1.9 не указано, чему соответствует цвет точек.

5. В описаниях результатов и методов исследования присутствуют несоответствия. Например, на стр. 104 (глава 3) автор пишет: «Все образцы собирались в одно и то же время (6 часов после включения света) при суточном цикле 12 часов света/12 часов темноты», тогда как на стр. 131 («Материалы и методы») утверждается, что образцы «собирались с 8 до 9 часов после включения света». Далее, в «Материалах и методах» описана количественная ПЦР в реальном времени для верификации результатов секвенирования РНК для генов *LFY*, *FLC*, *API* и *AG*, но указаний на эти данные нет в подразделе «Результаты» главы 3.

6. В тексте диссертации присутствуют орфографические и пунктуационные ошибки, а также опечатки (например, стр. 5, 4 строка сверху; стр. 7, 4 строка сверху; стр. 9, 1 строка сверху; стр. 16, 2 абзац, 5 строка снизу, и т.д.).

Заключение. Перечисленные выше замечания не снижают ценности представленной работы. Представленная диссертация на тему «Создание и анализ экспрессионных карт *Arabidopsis thaliana* и *Capsella bursa-pastoris*» полностью 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», 03.01.09 – «Математическая биология, биоинформатика».

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук

(специальность 03.01.03 – молекулярная биология)

Старший научный сотрудник сектора системной биологии морфогенеза растений

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Федеральный исследовательский центр

Институт цитологии и генетики

Сибирского отделения Российской академии наук»,

г. Новосибирск

Землянская Елена Васильевна

«17» ноября 2020 года

р.т. +7 (383) 363 49 63 вн. номер 3108

e-mail: ezemlyanskaya@gmail.com

Почтовый адрес:

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10

Телефон: +7(383) 363-49-80

Факс: +7(383) 333-12-78

E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

Подпись Е.В. Землянской заверяю

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН к.б.н.



Орлова Галина Владимировна