

ОТЗЫВ

официального оппонента

академика РАН, доктора биологических наук, профессора, заведующего
Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии
Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет» Нетёсова Сергея Викторовича
на диссертационную работу Бирюкова Михаила Юрьевича на тему
**«Происхождение и эволюция структурных вариантов *Tat* LTR-
ретротранспозонов зеленых растений»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7 – генетика

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа М.Ю. Бирюкова посвящена изучению происхождения и эволюцию структурных вариантов *Tat* LTR-ретротранспозонов зеленых растений, весьма интересной теме, раскрытие которой может помочь более полному выявлению роли таких транспозонов в эволюции зеленых растений в целом.

В качестве преамбулы необходимо отметить, что ретротранспозоны являются весьма значительной группой мобильных генетических элементов (МГЭ). Их отличительной особенностью является механизм перемещения по геному по принципу “копирование и вставка” (“copy-and-paste”) за счет процесса обратной (“ретро-”) транскрипции. При его обратной транскрипции на матрице мРНК ретротранспозона синтезируется его дополнительная ДНК-копия, которая затем встраивается в новое место в геноме. Благодаря этому свойству ретротранспозоны могут составлять очень большую долю в геномах эукариот, которая иногда достигает до 90% в случае геномов некоторых высших растений. Среди ретротранспозонов исследователи выделяют отдельный большой подкласс элементов с длинными концевыми повторами (LTR) - LTR ретротранспозоны. LTR-ретротранспозоны структурно и эволюционно близки ретровирусам позвоночных животных, что является дополнительным аргументом в пользу их изучения, а также обладают схожим с ними жизненным циклом. Основная разница состоит лишь в том, что ретровирусы животных могут покидать клетку организма-хозяина и, перемещаясь с током крови, способны заражать новые клетки, распространяясь в организме, и могут заражать другие организмы животных через половые и, иногда, другие контакты, в то время как жизненный цикл

LTR-ретротранспозонов растений, по крайней мере, по имеющимся сведениям, практически ограничен клеткой-хозяином.

В прошлом были первично исследованы некоторые элементы кластера *Tat* группы LTR-ретротранспозонов *Ty3/gypsy*, распространенного исключительно в геномах зелёных растений (Viridiplantae). Отличительной особенностью *Tat* LTR-ретротранспозонов от других LTR-элементов является наличие дополнительного домена рибонуклеазы H (RNH) в гене полипротеина (*pol*). Было также выявлено, что у элементов в данном кластере существуют различные структурные варианты, отличающиеся как положением дополнительного домена RNH внутри гена *pol*, так и присутствием/отсутствием дополнительных открытых рамок считывания с неясной функцией. Причём разнообразие структур *Tat* LTR-ретротранспозонов коррелирует с вертикальной эволюцией крупных таксонов зелёных растений. Однако все эти данные были получены преимущественно на геномах наиболее высокоорганизованных групп цветковых растений, а разнообразие таксонов нецветковых растений ограничивалось лишь одним геномом плауна (*Selaginella moellendorffii*; класс Lycopodiopsida) и тремя геномами хвойных (класс Pinopsida, семейство Pinaceae). К настоящему моменту значительно возросло количество геномных сборок представителей таксонов нецветковых и древних таксонов цветковых растений, открывая возможности для более детального исследования эволюции *Tat* LTR-ретротранспозонов на ранних этапах их дивергенции биоинформатическими методами. Кроме того, расширение числа исследованных в части данного признака геномов высших растений может пролить свет на происхождение и распространение дополнительного домена RNH у данных элементов.

Научная новизна

Автором было проведено большое и системно построенное исследование, значительная часть результатов которого была получена впервые. Здесь приведены наиболее важные из них по мнению оппонента:

1. Во-первых, весьма важным результатом является разработка алгоритма биоинформатического поиска мобильных элементов, содержащих белок-кодирующие домены (название алгоритма DARTS). Этот алгоритм помогает быстро проводить поиск LTR-ретротранспозонов групп *Ty1/Copia*, *Ty3/Gypsy*, *Bel/Pao*, DIRS, а также ретровирусов и *Penelope*-подобных элементов.

2. С помощью данного алгоритма впервые проведён поиск LTR-ретротранспозонов зелёных растений (конкретно – из кластера *Tat*), содержащих добавочный домен aRNH, среди геномов стрептофитовых водорослей, печёночных и антоцеротовых мхов, папоротников и древних таксонов семенных, а именно: гингковые, саговниковые, гнетовые, кипарисовые, тисовые, амборелловые, нимфовые и магнолииды. Всего в рамках поиска было исследовано 94 генома зелёных растений, выявлено пять структур элементов *Tat*, различающихся по положению добавочного домена aRNH, причем две из них - №№ 4 и 5 - описаны впервые.
3. Данные филогенетического и структурного анализов говорят в пользу конвергентности эволюции вышеуказанных элементов с эволюцией аналогичных элементов геномов ретровирусов позвоночных и LTR-ретротранспозонов *Chronos* и *Archon* оомицетов. В частности, тщательное изучение разнообразия этих выявленных структур свидетельствует в пользу единичного события захвата домена aRNH, опровергая прежнюю гипотезу о множественном захвате в ходе эволюции *Tat* LTR-ретротранспозонов.
4. Автором был изучен процесс деградации нативного домена RNH во всех группах в составе *Tat*. Показана связь между наличием добавочного домена aRNH и деградацией нативного RNH, выявленная во всех группах в равной степени. Деградация сразу двух из трёх доменов семейства RNH в одной из впервые выявленных структур косвенно свидетельствует в пользу предположения, что деградация явилась следствием конкуренции между доменами с одной функцией.

Структура и объем диссертации. Диссертация имеет традиционную структуру: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает 157 источников. Работа изложена на 103 страницах, содержит 17 рисунков, 2 таблицы и 7 приложений.

Введение посвящено обоснованию актуальности проблемы, даны краткие характеристики класса ретротранспозонов растений и описано их родство с ретровирусами животных. В этом разделе сформулированы проблемы, которые далее решаются в работе, поставлены цели и определены задачи работы. Также приведены главные характеристики работы, конкретизированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, сформулированы основные положения,

выносимые на защиту, приведены ссылки на публикации и апробации результатов, а также указан личный вклад автора в результаты исследования.

В **Обзоре литературы** описаны общие характеристики мобильных генетических элементов и конкретно ретротранспозонов растений, описан вклад мобильных генетических элементов в функционирование геномов эукариот и эволюционные последствия их наличия в этих геномах. Подробно рассмотрена классификация ретротранспозонов, их строение, жизненный цикл и функция их домена RNH. Отдельно описаны особенности *Tat* LTR-ретротранспозонов и их конвергентная эволюция.

В разделе **Материалы и методы** подробно описаны используемые источники геномных данных, существующие алгоритмы поиска транспозонов и использованные для разработки программы DARTS программные средства. Также приведены описание определения зависимости деградации нативного домена RNH от наличия добавочного домена aRNH и поиск дополнительных открытых рамок считывания.

В главе **Результаты** представлены подробные результаты разработки и применения алгоритма DARTS для поиска МГЭ и LTR-ретротранспозонов в частности. При этом было выявлено распространение содержащих aRNH элементов в геномах растений и их структурное разнообразие. Были выявлены кластеры *Tat*-элементов по домену RT, при этом проведено выявление филогенетических взаимоотношений доменов aRNH кластеров *Tat*. Были также сравнены степени деградации нативного домена RNH после приобретения aRNH и проведен анализ спорных элементов-синглетов с поиском добавочных открытых рамок считывания с кодирующими последовательностями.

В главе **Обсуждение** приведены возможные причины несоответствия филогенетических деревьев RT и RNH и причинно-следственной связи деградации нативного домена RNH в присутствии aRNH, описаны и обсуждены вновь найденные, вероятные, производные и преобладающие геномные структуры, имеющие отношение к ретротранспозонам. Обсуждается также специфичность кластеров *Tat* к различным таксонам растений и рассмотрены предполагаемые эволюционные сценарии для ретротранспозонов.

В **Заключении** подведены итоги проведенных исследований и подробно рассмотрены различные гипотезы и предположения по поводу механизмов и процессов о приобретении домена aRNH элементами кластера *Tat*.

По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, в том числе 3 статьи в рецензируемых российских и зарубежных журналах уровня не менее Q4 и из перечня ВАК.

Здесь приведен перечень тезисов конференций, на которых докладывались результаты работы:

1. Biryukov M., Ustyantsev K. Diversity and evolution of Tat LTR retrotransposon structures in non-flowering plants // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2020)–2020.–С.201-201.

2. Biryukov M., Ustyantsev K. LTR retrotransposons in green plants show multiple examples of convergent evolution // 12th International young scientists school «System Biology and Bioinformatics» (SBB-2020) – 2020. – С. 24-24.

3. Biryukov M. , Ustyantsev K. Diversity and evolution of structural variants of tat ltr-retrotransposons in green plants. // EMBO Workshop The Mobile Genome: Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements. 2021.

Ниже представлен перечень опубликованных работ в том виде, как указано в автореферате:

1. К. Ustyantsev, M. Biryukov, I. Sukhikh, N.V. Shatskaya, V. Fet, A. Blinov, I. Konopatskaia. Diversity of mariner-like elements in Orthoptera. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(8):1059-66.

2. M. Biryukov, K. Ustyantsev. DARTS: An Algorithm for Domain-Associated Retrotransposon Search in Genome Assemblies: 1 // Genes. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022;13(1):9.

3. Martinez P., Ustyantsev K., Biryukov M., Mouton S., Glasenburg L., Sprecher SG., Bailly X., Berezikov E. Genome assembly of the acoel flatworm *Symsagittifera roscoffensis*, a model for research on photosymbiosis. // G3 Genes| Genomes| Genetics. 2022; , P. 00(0), jkac336.

4. Biryukov M., Berezikov E., Ustyantsev K. Classification of LTR retrotransposons in the flatworm *Macrostomum lignano*. Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020. 6(2). DOI: 10.18699/Letters2020-6-12.

Содержание диссертационной работы соответствует опубликованным результатам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования М.Ю. Бирюкова и обоснованность основных положений, выносимых на защиту, заключения и выводов обеспечивается как современным уровнем исходных теоретических положений, так и разумной и адекватной задачам логикой плана исследования, использованием современных методов,

соответствующих поставленной цели и задачам, корректной статистической обработкой и интерпретацией полученных результатов.

Необходимо отметить личный вклад соискателя: все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Таким образом, рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Бирюкова Михаила Юрьевича является самостоятельным законченным исследованием, посвященным изучению происхождения и эволюции структурных вариантов некоторых транспозонов ряда семейств зеленых растений.

Полученные данные могут стать основой для создания в будущем способов улучшения полезных свойств изученных зеленых растений и повышения их устойчивости к факторам внешней среды.

Полученная диссертантом новая системно обобщенная информация может помочь разобраться в молекулярных факторах, лежащих в основе процессов эволюции зеленых растений, и применить полученных новые знания для разработки новых способов улучшения качеств этих растений методами синтетической биологии.

Практическая значимость выполненной работы не очевидна на настоящем этапе, но она просматривается в будущем как основа для разработки новых методов синтетической геномной инженерии в отношении изученных растений с целью получения их полезных модификаций.

Замечания

Принципиальных недостатков в работе не выявлено. Небольшим недостатком работы можно назвать отсутствие DOI в части списка публикаций статей и тезисов. Да и данные публикаций, в частности, статьи №3, приведены неточно и не полностью. Оппонент вынужден также отметить наличие ряда досадных опечаток. В частности, в автореферате на стр. 13, 4 строка сверху имеется непонятное слово «трёхоменной», в результате смысл фразы понимается только после многократного прочтения абзаца. Диссертационную работу с широким применением биоинформатических подходов такие опечатки не украшают.

Основные положения автореферата полноценно и всесторонне отражают материалы диссертационной работы. Опубликованные научные труды исчерпывающе представляют ее содержание. Научные положения, выносимые на защиту, достаточно полно отражены в опубликованных работах.

Заключение

Диссертационная работа Бирюкова Михаила Юрьевича является законченным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне. Основные результаты диссертационной работы были представлены на различных конференциях, и опубликованы в рецензируемых журналах из списка ВАК. Заключение и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью соответствуют задачам, поставленным в исследовании. Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации. Исходя из вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа «Происхождение и эволюция структурных вариантов *Tat* LTR-ретротранспозонов зеленых растений», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.7 – генетика», полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 20 марта 2021 г. №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Бирюков Михаил Юрьевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.7 – генетика».

Заведующий лабораторией бионанотехнологии,
микробиологии и вирусологии Факультета естественных наук
Новосибирского государственного университета,
академик РАН, д.б.н., профессор
E-mail: svn15@hotmail.com; netesov.s@nsu.ru;
тел. +7 (383) 363-42-03

Сергей Викторович Нетёсов

Подлинность подписи С.В. Нетёсова заверяю:

Ученый секретарь НГУ, к.х.н.

«25» __ октября __ 2023 года

Е.А.Тарабан



630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ). Тел. (383) 363-43-33. <http://www.nsu.ru>.