

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**о диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук ДЕВЯТИЯРОВА РУСЛАНА**  
**МАНСУРОВИЧА**

**на тему: «ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ**  
**ГЕНОМА, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ И ДИАПАУЗЕ**  
**ЭМБРИОНОВ АМНИОТ»**

**по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»**

Среди проблем молекулярной биологии и генетики эукариот одними из наиболее важных являются вопросы исследования регуляторных cis-действующих элементов генома, таких как промоторы, энхансеры и участки ДНК, подавляющие транскрипцию. Целью данной работы явилось создание транскриптомной базы данных для процесса эмбрионального развития на примере эмбрионов курицы. Это позволило выявить молекулярные механизмы раннего онтогенеза на уровне отдельных регуляторных элементов и расширить возможности их функционального анализа *in vivo*. Была впервые реконструирована динамика изменения транскрипционной активности на уровне отдельных генов, покрывающая этапы от откладывания яйца до проклевывания. Очевидно, нет необходимости говорить об актуальности и важности проблемы затронутой в диссертационной работе.

Накопление и анализ больших массивов данных по экспрессии генов на основе ряда новых платформ секвенирования быстро входят в исследовательскую практику для профилирования экспрессии генов. Однако, разные наборы секвенирования РНК часто отличаются длиной чтения, глубиной охвата, методами выделения РНК и выбора библиотеки. Для определенного набора данных эти переменные вместе могут влиять как на количество и тип обнаруживаемых генов, так и на точность оценок их уровня экспрессии. Однако, очевидно, что транскриптомные атласы являются

ценными ресурсами для функциональной геномики. Группы транскриптов, члены которых будут иметь похожие профили экспрессии, могут быть связаны с общей функцией в том или ином биологическом процессе. Этот принцип ранее использовался для аннотирования генов с неизвестными функциями у человека, свиньи, овцы и мыши. Информация о совместной экспрессии также является информативной в исследованиях сложных признаков, таких как, например, восприимчивость к заболеваниям. Тот принцип, что гены, вовлеченные в развитие одного и того же признака, как правило, экспрессируются в одном и том же типе клеток и участвуют в одном и том же биохимическом пути, был ранее уже подтвержден в нескольких исследованиях.

Эмбрионы курицы (*Gallus gallus*) уже были широко использованы как модельная система в клеточной биологии и биологии развития. Еще большую значимость этот объект исследований приобрел после полного секвенирования его генома. Более поздние молекулярно-биологические инновации, включая генерацию репортерных трансгенов и редактирование генома на уровне первичных зародышевых клеток, еще более усилили значимость курицы как модельного организма. Важно также, что транскриптомные исследования весьма важны для определения групп уникальных и универсальных генов, которые определяют различия в транскрипционной регуляции между курицей и мышью, наиболее глубоко изученным модельным организмом млекопитающих.

Диссертационная работа построена по традиционной для кандидатских диссертаций схеме, изложена на 121 странице и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, а также выводов. Диссертация включает 40 рисунков и 2 таблицы, библиографический список из 141 наименований.

Во введении достаточно четко сформулированы цели и задачи исследования, актуальность избранной темы, степень обоснованности научных положений и их достоверность и новизна.

В обзоре литературы рассмотрены ряд глобальных проектов по сборке геномов новых видов и созданию их аннотированных версий. Эти примеры включают GOLD, содержащий более 13500 секвенированных эукариотических геномов и проект «Genome 10K», нацеленный потенциально на сборку около 10000 геномов позвоночных. Указывается, что одной из тенденций последних лет стала практика использования геномов модельных организмов для получения новых сборок геномов других менее изученных видов, что позволяет снизить стоимости таких проектов.

Рассмотрены также подходы по созданию аннотаций транскриптомов, которые используют новые методы картирования РНК (например, EST, SAGE, RNA-seq). Отмечены их преимущества и недостатки. Отдельно обсуждаются проблемы, связанные с аналитической частью метода CAGE, включая выравнивание, уменьшение размерности, нормализацию. Описаны основные принципы подготовки библиотек CAGE и особенности их секвенирования на различных платформах (Illumina, HeliScope). Приводятся ключевые публикации проекта, в которых метод CAGE успешно применялся для характеристики на уровне промоторов и энхансеров как кодирующих, так и некодирующих РНК.

В другом разделе обзора рассматривается проблема изучения эмбрионального развития. Дано описание эмбриогенеза на примере курицы, включая уровни морфологии и физиологии. Специально рассмотрен аспект, связанный с особенностью эмбриона останавливать свое развитие при понижении температуры окружающей среды. В диссертации приведено детальное рассмотрение феномена гипотермальной диапаузы. Приводится обзор различных вариантов гибернации, указывается на промежуточное положение куриного эмбриона в такой адаптации между рептилиями и

млекопитающими. Обзор содержит всю необходимую информацию для ознакомления с историей проблемы и понимания общей значимости работы.

В разделе «Материалы и методы» представлен спектр современных методов, использованных автором в работе. Эти методы традиционны в данном направлении исследований и в диссертации весьма грамотно применены. Из этого раздела становится очевидным, что автор на высоком экспериментальном уровне владеет самыми современными методами молекулярной биологии и генной инженерии.

Экспериментальная часть диссертации включает несколько основных разделов. Первый раздел посвящен картированию стартовых точек транскрипции в куриных эмбрионах. При этом в целом было выявлено 142924 точки в условиях с мягким порогом фильтрации. При жесткой фильтрации было отобрано 31863 пика. На следующем этапе рассматривается поиск и валидация специфичных TSS, выявленных в работе. Были прокартированы стартовые точки транскрипции, начиная первого дня эмбриогенеза курицы и покрывающие этапы от прегастрюляции до ранних стадий образования сомитов. Также были определены группы промоторов активных на средних этапах развития, средне-поздних этапах (день 5-10, от окончательного гемопоза до хондрогенеза) и поздних этапах (день 15 и 20, формирование костей и перьев, терминальная дифференциация большинства других клеточных линий). Весьма важным и интересным этапом экспериментальной работы было картирование стартовых точек транскрипции при развитии гипотермальной диапаузы куриных эмбрионов. Кроме того, был проведен анализ дифференциальной экспрессии транскриптов. Оказалось, что среди 18304 исследованных TSS статистически значимо отвечают на понижение температуры лишь от 803 до 2514 промоторов.

В достаточно компактном обсуждении результатов проведен анализ полученных автором результатов и их сравнение с литературными данными. На наш взгляд, однако, этот раздел следовало бы существенно расширить. В

частности, хотелось бы увидеть более солидное обсуждение полученного автором массива данных с результатами работ на мышах, рыбах и насекомых.

В целом в тексте диссертации не так много опечаток. Однако, стилистически работа написана не очень удачно. В частности, встречаются логически плохо построенные фразы. Например, “метод CAGE успешно применялся для характеристики таких процессов на уровне промоторов как кодирующих, так и не кодирующих РНК, и далее на уровне энхансеров”. Кроме того, обнаруживаются жаргонизмы, которые не приняты пока в русском языке. В частности, вместо понятия набор промоторов в геноме используется англицизм “Промотером”. Весьма странно звучит вывод 5 диссертации “Регуляция перехода к состоянию гипотермальной диапаузы отличается от голодания, спячки и эмбриональной диапаузы - связана с известными метаболическими путями лишь фрагментарно ”.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации “Исследование регуляторных элементов генома, участвующих в развитии и диапаузе эмбрионов амниот” соответствует паспорту специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» (по Биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Девятияров Руслан Мансурович

заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,

Зав. лабораторией геной инженерии вирусов

НИИФХБ им. А.Н. Белозерского,

профессор МОРОЗОВ Сергей Юрьевич

25 апреля 2019 г.

Контактные данные:

тел.: 7(495)939-31-98, e-mail: morozov@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.01.03 – «молекулярная биология»

Адрес места работы:

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Подразделение МГУ «Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского»

Тел.: +7 (495) 939-53-59; e-mail: fxb@genebee.msu.ru

Подпись сотрудника С. Ю. Морозова удостоверяю:

