

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу
Терехановой Надежды Владимировны
«Неравномерность мутагенеза и отбора в геноме позвоночных»
Представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

Работа посвящена проблеме гетерогенного характера изменчивости в пределах индивидуальных последовательностей ДНК (в данной работе она называется локальной изменчивостью ДНК). При расшифровке темы объясняется, что в последовательности ДНК с течением времени появляются мутации, которые могут закрепляться по тем или иным причинам, накапливаться или, наоборот, исчезать. И на разных участках последовательности скорости всех этих процессов неодинаковы, что приводит к итоговой неравномерной локальной изменчивости: где-то число нуклеотидных замен больше и расположены они близко друг к другу, а где-то они разрежены и возникают спорадически.

Эта проблема исключительно интересна и важна для понимания как механизмов эволюции, так и количественных оценок скоростей эволюции для реконструкций времени точек ветвления, составления правдоподобных филогенетических схем. Этим определена актуальность заявленной в работе проблемы.

В представленной диссертационной работе данная проблема решается с помощью двух разных подходов, соответствующих и двум поставленным задачам. Первый подход – анализ геномных факторов, определяющих эту неравномерность; и первая задача – изучение закономерности изменения локальной скорости мутирования в ходе эволюции. Иными словами, насколько долго в филогенетическом ряду сохраняется определенная картина локальных неравномерностей мутирования и какие факторы наилучшим образом определяют гетерогенность мутирования. Данная задача решалась с использованием известных последовательностей ДНК нескольких видов приматов. Это хороший объект, так как он сразу выводит работу в разряд практически важных с позиций медицинской генетики. Второй подход – выявление конкретных участков последовательности ДНК с повышенной плотностью мутаций и их соотношение с адаптивным процессом. И соответственно вторая задача – исследование структуры и свойств участков повышенной изменчивости (т.н. «островов дивергенции») у представителей разных популяций, адаптированных к разным условиям обитания, Эта часть работы выполнена на материале трехиглой колюшки Белого моря. Она показала детали геномных сдвигов, нацеленных на быструю адаптацию.

Научная новизна работы связана с вовлечением большого массива новой информации по полногеномным прочтениям у различных видов приматов, а также получением надежных полногеномных данных для интереснейшего с эволюционной точки зрения объекта – трехиглой колюшки Белого моря. Интересен также и новый метод анализа локальной неравномерности в смешанной (объединенной) выборке колюшек. И то и другое позволило подробно проанализировать разницу плотностей мутаций в последовательности ДНК выбранных объектов, рассмотреть, как она меняется в пределах одного вида в масштабе исторического времени, а также на геологическом временном масштабе в пределах группы близкородственных видов. Таким образом, Н.Тереханова дала представление о геномных сдвигах как на начальных этапах видообразования, так и при далеко ушедшей дивергенции видов.

Работа написана на 94 страницах, куда входят 45 рисунков, 8 таблиц и 131 цитирование на 9 страницах. Структура работы соответствует двум поставленным задачам (в главе 1 разбирается первая задача, в главе 2 – вторая). Предваряет обе главы обзор литературы. В нем пунктирно описаны методические приемы, применяемые для выявления и анализа неравномерности в плотности мутаций вдоль последовательности ДНК, и несколько более подробно факторы, влияющих на формирование этой локальной изменчивости. По теме диссертации опубликовано 2 статьи в иностранных высокорейтинговых журналах, а также сделано 3 доклада на российских и 4 доклада на международных конференциях.

Содержательная часть, касающаяся первой, филогенетической, задачи, изложена в главе 1. Она направлена на выявление гетерогенности топологии полиморфизмов (учитывалось их плотность и относительное расположение по геномным выравниваниям) в геномах 9 различных видов приматов, включая человека. Затем сравнивалось положение высоко- и низкоизменчивых участков с оценкой попарных корреляций между выбранными видами приматов: насколько сходны профили изменчивости у видов с разной степенью родства. На следующем этапе это сходство рассматривалось с позиций действия ключевых факторов, определяющих темпы накопления мутаций. Здесь использовались геномные карты по скорости рекомбинации различных участков последовательностей, темпы мутирования у видов, состав гистонов, ГЦ-смещенная конверсия, метилирование ДНК, распределение нуклеосом, взятые из ресурсов открытого доступа. Для контроля филогенетического фактора привлечен тот же набор геномных характеристик мыши как наиболее удаленного филогенетического родича; их геномные координаты конвертированы в координаты по геному человека, а затем проведено сопоставление указанных свойств.

В результате были несколькими методами подсчитаны локальные скорости мутирования у приматов. Оценки по разным методам в целом оказались близки, что говорит о правдоподобности и самих оценок, и валидности использованных методов. Сопоставление локальных скоростей мутации в филогенетических линиях позволило сделать интересный вывод: профиль мутирования при формировании нового вида наследуется в значительной степени, и, судя по показателям дисперсии в скоростях мутирования у человека и шимпанзе, эта унаследованность может достигать 80%. Однако с ростом филогенетической дистанции роль унаследованной неравномерности быстро сходит на нет. Иными словами, чем дальше от предкового вида, тем больше индивидуальных свойств в профиле локальной скорости мутирования у того или иного вида. Также интересно, что даже у далеких по родству видов, в данном случае у человека и мыши, все же остается некоторая унаследованность неравномерности мутирования (рис. 20, 21а). И природа этой небольшой консервативной части может стать темой отдельного исследования. Этот вопрос отчасти проясняется сопоставлением скорости мутирования и интенсивности рекомбинации у человека и мыши, обнаруживающие хоть и слабую, но все же значимую корреляцию.

В диссертации убедительно продемонстрировано, что у приматов наибольший вклад в формирование профиля локального мутирования вносят вариации частоты рекомбинации в конкретных локусах. Объем дисперсии, которую можно отнести за счет этого фактора, составляет у близких видов человека и шимпанзе около 5-7% (на самом деле совсем немного). Остальные факторы имеют еще меньшее значение. Так что унаследованность профиля мутирования от предкового вида действительно оказывается важным фактором.

Три защищаемых положения (1-3) относятся к этой части исследования. Все они выглядят достаточно обоснованными, так что их разбор кажется здесь излишним.

Вторая глава диссертационной работы касается гетерогенности скоростей мутирования в связи с процессом адаптации к новым условиям. Конкретно разобрана адаптация беломорской морской колюшки к пресноводным условиям. Колюшка является на настоящий момент одним из немногих видов, у которых обнаружены бесспорные участки с повышенным темпом мутирования, связанные с отбором на приспособленность. Это т.н. острова дивергенции. Беломорские популяции – исключительно интересный объект для их исследования, так как почти для каждой популяции известно время ее основания. Это означает, что можно получить хорошую временную развертку адаптивного процесса. Более того, диссертантка использовала в работе материалы по искусственным популяциям, основанным в 1978 году специально для изучения

адаптивного процесса, и теперь с привлечением новых технологий мы можем видеть результаты этого замечательного долговременного эксперимента.

В данной работе сравниваются геномные профили мутирования у двух морских популяций и двух пресноводных с возрастом несколько столетий и две искусственные пресноводные популяции. Привлечены данные масштабного геномного секвенирования образцов из этих популяций, полученные в ходе выполнения работы.

Методика работы хорошо продумана: она основана на выявлении и картировании по хромосомам маркерных мутаций. Необходимым условием для отнесения полиморфизма к маркерным была его повышенная частота (80% или более; или 50% или более) у морских популяций и напротив ее отсутствие у пресноводных, и соответственно наоборот, присутствие у пресноводных при отсутствии у морских. Острова дивергенции как сгущение маркерных мутаций выявлялись по критерию общности и различия между морскими и пресноводными образцами.

Диссертантка выделила 19 таких сгущений на 10 хромосомах (из 21ой) и показала, что большинство, 95% , маркерных мутаций расположены внутри этих сгущений. Большой объем различий между морскими и пресноводными популяциями не позволяет допустить образование мутаций заново в каждой популяции, и, как верно заключает Н.Тереханова, дело тут в балансирующем отборе. Процесс адаптации в каждом случае приводил к повышению частоты полезных аллелей. А источником этих аллелей являлся генофонд морских колюшек.

Обзор маркерных полиморфизмов, представленный в работе, показал, что по сравнению с немаркерными полиморфизмами в них повышена доля несинонимичных замен. Это означает, что отбор сильнее затрагивает маркерные полиморфизмы, собранные в островах дивергенции. Однако автор работы аккуратно интерпретирует эти результаты, потому что не все острова дивергенции, как выясняется, содержат белок-кодирующие гены, и не все содержат несинонимичные маркерные замены, также вне островов дивергенции сильно повышена доля маркерных ДНК с несинонимичными заменами. Так что, как правильно отметила Н.Тереханова, ситуация не столь прямолинейна, как это всегда и бывает в биологии, и отбор работает и с островами дивергенции, и вне их. Но все же в целом частоты маркерных аллелей в пределах островов дивергенции выше, чем за его пределами (это рис. 43 и 44).

Представлены значения коэффициентов отбора, рассчитанные для каждого острова дивергенции. Судя по сравнительным данным, которые привела диссертантка, величины интенсивности отбора хоть и весьма высокие ($>0,1$), но вполне ожидаемы для данной ситуации и характерны для популяций, находящихся в условиях балансирующего отбора.

Защищаемых положений, относящихся к этой части работы, два. Первое констатирует наличие локальных участков генома с повышенным числом полиморфизмов, вовлеченных в процесс адаптации к пресноводным условиям; в этих локальных зонах показатели скорости эволюции повышены. И это положение можно считать обоснованным. Второе положение входит как часть в первое – «показано, что на острова дивергенции при адаптации действует сильный отбор». Поэтому оно в качестве отдельного положения, не обязательно. Или же должно быть как-то по-другому сформулировано.

Основные замечания к работе:

1. Слишком краткое описание методик как получения и обработки первичного материала, так и анализа сиквенсов. Трудно понять, как именно получены массивы локальных скоростей мутирования для последовательностей приматов; чтобы это понять, приходится идти по ссылкам, не всегда легко доступным.

2. Недоучет дрейфа генов. Во Введении там, где речь идет о формировании различий между аллопатрическими или симпатрическими популяциями, дрейф не упомянут вовсе, а его упоминание встречается лишь два раза в качестве побочного механизма фиксации мутаций при формировании остовов дивергенции. В тексте все время повторяется, что накопление различий идет за счет адаптаций. Это явная схематизация и упрощение процесса видообразования, в особенности у колюшек, где численности популяций основательниц чрезвычайно низки.

3. Проходные формы колюшки в оз. Ершовском считаются морскими (табл. 4, стр. 25, 62). Не объяснено, с чем связано такое объединение. Вполне вероятно, что у проходных форм имеются свои адаптации к такому образу жизни, и соответственно изменены частоты пресноводных и морских аллелей. Кроме того, пример с резидентными колюшками оз. Ершовского, которые, как считается, попали в озеро примерно 34 года назад, не очень удачен, потому что это мог быть любой занос пресноводных форм в течение этого времени. Кроме того, озеро Ершовское само по себе имеет сложную топологию и гидродинамику (разделено на две части, в одной из них часть глубинной воды соленая), так что источник пресноводных колюшек в этом озере и пути их адаптаций становятся еще более неопределенными.

4. Расчет коэффициента отбора для колюшки выполнялся при предположении отсутствия генетического дрейфа, что в таких маленьких популяциях (40 особей или две в случаях карьеров Голубого и Малыш) очень маловероятно.

5. Небрежное оформление: рисунки трудно понять, так как не подписаны или неправильно подписаны оси, не дописана или неправильно написана легенда или

объяснения к рисункам (это рис. 1, 5, 6, 9, 10, 11, 13 и т.д; табл. 5), размерность скорости рекомбинации – сантиморганы (сМ) – выглядит как сантиметры (см), а в отдельных местах размерности характеристик не указаны вовсе; в списке литературы русские работы почему-то даны на английском языке, у некоторых (см.№54) не дописаны выходные данные.

Заключение. В целом нужно отметить, что работе использован целый ряд методик современной биоинформатики, и Н.В.Тереханова показала хорошее умение чередовать их по мере поступления новых вопросов. Диссертантка провела свою работу на хорошем интересном материале, как полевом, так и выбранном из интернет-ресурсов. Используются различные статистики, программные продукты для обработки и анализа результатов секвенирования и геномных прочтений, кластеризации, методы очистки данных, из которых почти нацело и состоит работа биоинформатика. Нужно также отметить, что в работе видно неплохое знакомство с современной литературой, касающееся темы диссертации. По теме работы опубликованы две статьи. Все это позволяет рекомендовать автора работы Н.В.Тереханову для присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – “математическая биология и биоинформатика”; работа полностью удовлетворяет требованиям пункта 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утверждённым Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21 апреля 2016 г., №478 от 2 августа 2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Наймарк Елена Борисовна
доктор биологических наук,
вед.науч.сотрудник ПИН РАН
(Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Палеонтологический институт
им. А.А.Борисяка
Российской Академии Наук)
117647, ул.Профсоюзная, 123;
Тел.+7(499)3397911,
naimark@paleo.ru



ПОДПИСЬ РУКИ Наймарк Е.Б.
ЗАВЕРЯЕТСЯ 21.01.2019
Нач. прот. отд. Палеонтологического
института им. А. А. Борисяка РАН

