ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Храмеевой Екатерины Евгеньевны «Дальние взаимодействия в геномах эукариот и регуляция сплайсинга», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Проведение исследований, связанных с необходимостью анализа полногеномных данных, невозможно без использования биоинформатики. Освоенная Храмеевой Е.Е. сумма методов биоинформатики, а также разработанный автором диссертации оригинальный метод поиска консервативных вторичных структур РНК, ассоциированных со сплайсингом, позволили на полногеномном уровне выполнить работы по изучению механизмов регуляции альтернативного сплайсинга вторичными структурами РНК и белковыми факторами, а также исследовать представленность явления транс-сплайсинга у млекопитающих. Исследованием явления сплайсинга занимаются уже более 35 лет, однако, регуляция сплайсинга – сложный, и до сих пор малоизученный процесс, в котором участвуют множественные факторы самой различной природы. Поэтому проведенные автором исследования, позволившие получить новые знания в области регуляции сплайсинга, несомненно, являются актуальными.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, трех глав, в которых изложены результаты исследования, заключения и библиографии. Общий объем диссертации 108 страниц, включая 42 рисунка и 3 таблицы, а также 87 цитированных источников.

Во *введении* сформулирована цель работы, обоснована ее актуальность, научная новизна и практическая значимость, перечислены выносимые на защиту положения.

В *обзоре литературы* приведен достаточно подробный анализ современной литературы по темам, рассмотренным в диссертации. Обзор

написан хорошим литературным языком, и подробно проиллюстрирован. В заключительной части обзора в виде выводов изложены основные факты, о которых шла речь.

Достаточно нетрадиционно оформлены в диссертации собственные исследования, подразделенные на три независимые главы, каждая из которых, в свою очередь, содержит разделы «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение» и «Выводы», отличающиеся от общих выводов по диссертационной работе. Читать результаты исследований в таком формате достаточно удобно, однако, такая форма изложения затрудняет восприятие целостности диссертационной работы.

Глава 1 посвящена изучению механизмов регуляции сплайсинга вторичными структурами РНК. Этот вопрос интересовал исследователей со времен открытия сплайсинга. Вторичные структуры могут изменять эффективность распознавания сайтов сплайсинга и таким образом участвовать в формировании различных сплайс-изоформ гормона роста, генов tau, Hprt и hnRNPA1 человека. Ошибки сплайсинга, обусловленные влиянием вторичных структур РНК, приводят к таким патологиям, как мышечная дистрофия, кистозный фиброз и паркинсонизм. При этом нет никаких оснований полагать, что таким коротким списком ограничиваются все существующие в природе гены, на сплайсинг которых оказывает влияние вторичная структура РНК. Поэтому поиск вторичных структур РНК, оказывающих влияние на процесс сплайсинга, является важной фундаментальной задачей молекулярной биологии. В работе Храмеевой Е.Е. разработан новый эффективный метод поиска консервативных вторичных структур, ассоциированных со сплайсингом, с помощью хэширования. С его помощью у млекопитающих предсказано несколько сотен генов, содержащих консервативные вторичные структуры. Значимость этого результата не вызывает сомнений. Участие консервативных вторичных структур в регуляции альтернативного сплайсинга подтверждено тем, что они представлены в альтернативно сплайсируемых генах чаще ожидаемого.

Глава 2 посвящена изучению механизмов регуляции сплайсинга белковыми факторами на примере белка hnRNPL. Представители белкового семейства hnRNP являются одними из наиболее многочисленных регуляторов альтернативного сплайсинга, выполняющими самые разнообразные функции в метаболизме РНК: упаковка только что синтезированных транскриптов; регуляция конститутивного и альтернативного сплайсинга; транспорт молекул мРНК и их локальная трансляция; регуляция стабильности мРНК; активация или репрессия трансляции. Белок hnRNPL является одним из наименее изученных представителей семейства, однако было экспериментально подтверждено несколько случаев регуляции сплайсинга белком hnRNPL. Учитывая широкую представленность этого белка в клетке, влияние белка hnRNPL на сплайсинг, вероятно, не ограничивается несколькими отдельными примерами. Поэтому изучение механизма регуляции сплайсинга белком hnRNPL на полногеномном уровне является важной задачей. В работе Храмеевой Е.Е. впервые показано, что позиция связывания белка hnRNPL определяет его активаторное или репрессирующее влияние на сплайсинг, т.к. распределение позиций связывания hnRNPL вокруг 5'- и 3'-сайтов сплайсинга различается между альтернативными и константными экзонами, а также между L-активируемыми и L-репрессируемыми экзонами. Результаты работы также указывают на то, что белок hnRNPL регулирует стабильность мРНК за счет конкуренции с микроРНК и, возможно, участвует в биосинтезе мякРНК. Значимость и достоверность данных результатов не вызывает сомнений, тем более, что результаты находятся в хорошем соответствии с экспериментальными данными, полученными группой исследователей из Гиссенского Университета (Германия), в соавторстве с которыми выполнен данный фрагмент диссертационной работы.

Глава 3 посвящена изучению распространенности транс-сплайсинга, особой формы процессинга РНК, в результате которой экзоны, находящиеся на двух разных молекулах РНК, стыкуются и лигируются. Транс-сплайсинг

был открыт в 1986 г. у трипаносом, затем у нематод и плоских червей. Существуют также экспериментальные подтверждения транс-сплайсинга в генах JAZF1, SLC45A3 и ELK4 человека. С помощью современных методов секвенирования было показано наличие транскриптов, состоящих из сегментов последовательностей, локализующихся на разных хромосомах. Некоторые из этих транскриптов образуются в результате генетических перестроек у объекта секвенирования (чаще всего, в опухолевых клетках), другие образуются в нормальных тканях в результате транс-сплайсинга. Результаты работы Храмеевой Е.Е. указывают на то, что транс-сплайсинг происходит в клетках человека гораздо чаще, чем считалось ранее. Пространственно близкие фрагменты ДНК образуют между собой больше потенциальных продуктов транс-сплайсинга, чем пространственно далекие. Также, пространственно близкие фрагменты ДНК имеют схожие эпигенетические состояния хроматина, гены в них функционально подобны и ко-экспрессируются. Эти результаты представляют значительный интерес с точки зрения развития представлений о функционировании геномов млекопитающих.

В *заключении* обобщены основные результаты работы.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы. Результаты диссертационной работы опубликованы в четырех статьях в высокорейтинговых международных журналах.

Достаточно удачным представляется название диссертационной работы – «Дальние взаимодействия в геномах эукариот и регуляция сплайсинга» - в качестве попытки идейно объединить исследования, выполненные в диссертации. Однако осознание этого приходит уже после прочтения всей работы и попыток связать воедино полученные результаты. К сожалению, в тексте диссертации – ни в вводной части, ни в последующих главах, автор не потрудился прояснить связь названия с сущностью работы, и используемый в названии малоупотребимый в биологической литературе термин «дальние взаимодействия», нигде не объясненный, будоражит воображение читателя

вплоть до самой последней главы, где он, наконец, используется, первый и единственный раз, в контексте взаимодействия между участками разных хромосом.

Общие выводы диссертационной работы вполне обоснованы и подтверждены полученными результатами. Однако стремление автора к лапидарности изложения иногда приводит к появлению не вполне корректных формулировок. Например, в выводе 7 упоминается «зависимость профилей экспрессии генов от лаборатории». Наверно, было бы правильнее сформулировать эту фразу, как «зависимость профилей экспрессии генов от особенностей реализации протоколов секвенирования в различных лабораториях», или что-нибудь в таком роде.

Работа написана четко, хорошим русским языком, почти (см., например, стр. 30, 7 строка снизу: 3.3. Регуляция спРайсинга…) не содержит ошибок и опечаток. Иногда (очень редко) встречаются не вполне удачные выражения, например, на стр. 83, подпись к Рис. 3.5: «геномных фрагментов, происходящих с разных хромосом». Некоторые нарекания вызывает недостаточно хорошее разрешение отдельных иллюстраций, вероятно, в большинстве случаев представляющих собой рисунки, скопированные из статей.

Высказанные замечания ни в коей мере не снижают научную значимость полученных автором результатов. Научные положения и сформулированные в диссертации выводы убедительны, обоснованы, подкреплены многочисленными вычислительными экспериментами. Диссертационная работа Храмеевой Е.Е. является законченной научно-исследовательской квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и имеющей существенное научное и практическое значение в области биоинформатики.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Храмеевой Е.Е. «Дальние взаимодействия в геномах эукариот и регуляция сплайсинга» соответствует критериям «Положения о порядке присуждения

ученых степеней», утвержденного Постановлением №842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Главный научный сотрудник
лаборатории биологически активных наноструктур
федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ,
доктор биологических наук, профессор

Карягина-Жулина Анна Станиславовна

20 октября 2014 г.
123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18; тел. +7(926)4955132;
akaryagina@gmail.com

Подпись д.б.н., проф. Карягиной-Жулиной А.С. заверяю.
Ученый секретарь ФГБУ «НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России,
к.б.н. Кожевникова Л.К.