

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: 8-499-135-60-89, 8-499-135-98-84 Факс: 8-499-135-4105

E-mail: info@genebiology.ru

ИНН 7736020369 КПП 773601001 ОГРН 1027739618037 ОКПО 00244660

19 января 2015 г.

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Храмеевой Екатерины Евгеньевны «Дальние взаимодействия в геномах эукариот и регуляция сплайсинга», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 «Математическая биология, биоинформатика».

Основная часть диссертационной работы Екатерины Евгеньевны Храмеевой посвящена полногеномному изучению механизмов регуляции сплайсинга, опосредованных вторичными структурами РНК и белковыми факторами (на примере белка hnRNPL). Кроме того, в работе рассматривается взаимосвязь топологии генома и событий транс-сплайсинга, приводящих к возникновению химерных мРНК, образованных экзонами из разных генов. На мой взгляд, данная работа является в высшей степени актуальной как минимум по двум причинам. Во-первых, предпринята успешная попытка изучения механизмов сплайсинга с одной стороны на структурном уровне – это *in silico* поиск ассоциированных со сплайсингом вторичных структур РНК и характеристика позиций связывания белка hnRNPL с РНК, с другой стороны – исследование проведено в полногеномном масштабе. Полученные автором данные вносят значительный вклад не только в понимание того, каким образом клетка управляет сплайсингом в целом на уровне структуры РНК, но также указывают на роль вторичных структур РНК в регуляции альтернативного сплайсинга, что в последующем может послужить толчком к раскрытию «молекулярных инструкций», по которым происходит альтернативный сплайсинг в данном конкретном типе клеток. Эта информация важна не только с точки зрения

понимания фундаментальных основ функционирования генома, но и для медицинской науки, поскольку ряд патологий человека ассоциирован с ошибками сплайсинга, и раскрытие механизмов регуляции этого процесса может дать развитие новым направлениям в терапии подобных заболеваний. Вторая причина, по которой данная работа является актуальной, заключается в том, что в ней предпринята первая систематическая попытка проследить взаимосвязь между пространственной организацией генома и сплайсингом. Топология хроматина на сегодняшний день является одним из приоритетных направлений в молекулярной биологии и эпигенетике. В большом числе ранее опубликованных работ показана чёткая взаимосвязь укладки ДНК в ядре с такими проявлениями функциональной активности генома, как транскрипция и репликация, но данные о том, как связаны топология и сплайсинг до последнего времени практически отсутствовали. Автором же данной диссертационной работы убедительно показано, что события транс-сплайсинга чаще происходят между районами генома, сближенными в пространстве ядра. Таким образом, получено первое свидетельство того, что топология хроматина в масштабах целого генома оказывает влияние на репертуар производимых клеткой РНК не только на уровне транскрипции, но и на уровне процессинга предшественников мРНК.

В целом, представленная диссертация построена по не вполне традиционному плану – экспериментальная часть разделена на три главы, каждая из которых содержит раздел, описывающий использованные в данной главе методы, полученные результаты, краткое их обсуждение и выводы. Это в значительной мере облегчает понимание текста. Глава 1 посвящена поиску вторичных структур РНК, ассоциированных с регуляцией сплайсинга. Важно отметить, что автором разработан оригинальный метод для решения этой задачи, не требующий выравнивания ортологичных последовательностей, что позволило избежать технических ошибок, часто возникающих в этой процедуре. Задав условие, что мотив искомой вторичной структуры должен располагаться в пределах 150 п.н. внутри интрона от донорного или акцепторного сайта, содержать минимум две пары GC и быть консервативен хотя бы в 9 из 12 использованных геномов млекопитающих, Е. Храмеева обнаружила 167 потенциальных вторичных структур РНК в районах донорных и акцепторных сайтов сплайсинга. Особый интерес представляет то, что в окрестностях сайтов альтернативного сплайсинга эти вторичные структуры встречаются примерно в 3 раза чаще ожидаемого, что свидетельствует в пользу их участия в регуляции событий альтернативного сплайсинга. На основе полученных данных предложена и экспериментально проверена на гене SF1 модель, согласно которой образование вторичных структур по крайней мере в некоторых случаях критически важно для

правильного вырезания интрона. В главе 1 содержится одно не вполне понятное место: изначально автор приводит 10 млекопитающих, чьи геномы предполагается использовать в анализе, а затем в тексте фигурируют уже 12 геномов. Осталось не ясным, описка это или отражение того факта, что в изложении проделанной работы отсутствуют некие важные детали обработки данных.

В главе 2 исследуется вопрос о роли белка hnRNPL в регуляции сплайсинга. Е. Храмева, используя данные iCLIP, предоставленные группой Биндереяфа из университета Юстуса-Либиха (Гиссен, Германия), определила полногеномный профиль связывания этого белка с РНК в клетках HeLa. Из результатов анализа следует, в частности, что (1) в окрестностях сайтов связывания белка hnRNPL (участки последовательности от -30 до -10 и от +10 до +30 по отношению к позиции связывания) значительно обогащены CA-повторы и CA-мотивы (что подтверждает данные, полученные ранее другими авторами); (2) плотность сайтов связывания hnRNPL выше в окрестностях альтернативных сайтов сплайсинга; (3) hnRNPL часто связывается вблизи мишеней микроРНК в области 3'UTR. Последний факт указывает на то, что, вероятно, hnRNPL конкурирует с микроРНК за сайты связывания с 3'UTR. На основании этого автор выдвигает предположение о существовании глобального механизма регуляции активности транскриптов в цитоплазме. В этой части обсуждения результатов, на мой взгляд, не хватает информации о том, показано ли для данного белка или других 3'UTR-связывающих белков в прямых биохимических экспериментах фактов конкуренции с микроРНК и подавления RISC-опосредованной репрессии трансляции.

Глава 3 посвящена взаимосвязи транс-сплайсинга и топологии генома. Здесь показано, что между пространственно сближенными регионами генома транс-сплайсинг протекает достоверно чаще ожидаемого. Очень уместным представляется приведённый здесь же анализ эпигенетического статуса сближенных участков генома, показывающий, что партнёры по пространственным контактам схожи по набору эпигенетических маркеров и содержат коэкспрессирующиеся и функционально родственные гены. Вероятно, было бы интересно посмотреть, какие белковые мотивы кодируют продукты транс-сплайсинга между партнёрами по пространственным контактам и не приводит ли транс-сплайсинг к возникновению белковых укладок, не характерных для белков, кодируемых генами, чьи мРНК подвергаются транс-сплайсингу. Однако, это, конечно, предмет отдельного исследования.

С позиции оценки рукописи, хотелось бы отметить, что диссертационная работа написана хорошим литературным языком и очень легко читается. Обзор литературы логично структурирован и содержит всю информацию, необходимую для понимания

целей работы и её содержания. Выводы чётко следуют из приведённых результатов и сформулированы корректно.

Подводя итог, следует обратить внимание и на то обстоятельство, что результаты диссертации представлены в 4 статьях, опубликованных в авторитетных международных журналах, а также в тезисах 11 конференций, что лишний раз указывает на высокую ценность и актуальность полученных в данной работе результатов. Можно утверждать, что диссертационная работа Екатерины Евгеньевны Храмеевой на тему «Дальние взаимодействия в геномах эукариот и регуляция сплайсинга» полностью удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», (в редакции постановления Правительства РФ №842 от 23 сентября 2013 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «Математическая биология, биоинформатика».

Н.с. Лаборатории структурно-функциональной организации хромосом

Института биологии гена РАН

к.б.н. Ульянов Сергей Владимирович

Тел. 8(495)135-30-92, 8(915)160-60-33.

E-mail: sergey.v.ulyanov@gmail.com

21 января 2015



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)
Подпись лица <i>С.В. Ульянова</i>
заверяю,
Ученый секретарь
Института

