

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.077.04  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ПРОБЛЕМ ПЕРЕДАЧИ  
ИНФОРМАЦИИ ИМ. А.А. ХАРКЕВИЧА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_  
решение диссертационного совета  
от 24 апреля 2017, протокол № 4

о присуждении Степану Владимировичу Денисову, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Отбор и эпистаз в сайтах сплайсинга» по специальности 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика, принята к защите 20 февраля 2017 года, протокол № 2 диссертационным советом Д 002.077.04 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук (127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1., приказ о создании № 978/нк от 16 декабря 2013 года).

Соискатель Денисов Степан Владимирович, гражданин Российской Федерации, 1984 года рождения, в 2006 году окончил с отличием биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, по специальности «Биохимия». В период подготовки диссертации, с 01.11.2006 по 01.11.2009 обучался в аспирантуре на факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, затем работал в ИППИ РАН (с 28.03.2011), где продолжает работать в должности и.о. младшего научного сотрудника по настоящее время.

**Диссертация выполнена** в учебно-научном центре “Биоинформатика” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института

проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук.

**Научный руководитель** – Михаил Сергеевич Гельфанд, доктор биологических наук, кандидат физико-математических наук, профессор, зам. директора по научной работе, заведующий учебно-научным центром “Биоинформатика” Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук.

**Официальные оппоненты:**

1. Алексей Владимирович Кочетов гражданин РФ, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».
2. Алексей Дмитриевич Неверов, гражданин РФ, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального бюджетного учреждения науки Центрального НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук в своем **положительном** заключении, подписанном кандидатом физико-математических наук Артёмом Сергеевичем Касьяновым, научным сотрудником лаборатории системной биологии и вычислительной генетики ИОГен РАН и утвержденном доктором биологических наук профессором Серикбай Каримовичем Абилевым, заместителем директора по научной работе ИОГен РАН указала ряд замечаний.

1. «В разделе 2.1 диссертации следовало бы дать более подробное описание структуры сплайсосомы с приведением перечня основных, входящих в неё белков, либо дать какую-нибудь



информацию о способе их наименования, отсутствие данных сведений может приводить к затруднению понимания раздела, посвященного описанию взаимодействия сплайсосомы и сайта сплайсинга».

2. «На стр. 16 диссертации упоминается E-комплекс без объяснения что под ним имеется ввиду».
3. «На рис. 4 и 11 диссертации присутствуют фрагменты рамки рисунка. Так же на рисунке 4 присутствуют прямоугольники двух разных цветов, но в легенде не указывается какую смысловую нагрузку несут цвета».
4. «На стр. 20 диссертации вместо “экзоном” должно быть “экзонов”».
5. «Автором вводится обозначение для коэффициента отбора ( $s$ ), но так же широко встречающиеся обозначения для эффективного размера популяции и частоты мутаций ( $N_e$  и  $\mu$ ) даются без предварительной расшифровки».

Несмотря на замечания, в отзыве содержится высокая оценка научного уровня выполненной работы.

**Соискатель имеет 4 статьи** в российских и международных рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, из них 3 статьи по теме диссертации, общим объемом 41 страница. Соискателем опубликовано 6 работ в материалах российских и международных конференций.

**Публикации:**

1. S. Denisov, G. Bazykin, A. Favorov, A. Mironov, M. Gelfand (2015) Correlated evolution of nucleotide positions within splice sites in mammals. PLOS ONE 10(12): e0144388.
2. S. Denisov, G. Bazykin, R. Sutormin, A. Favorov, A. Mironov, M. Gelfand, A. Kondrashov (2014) Weak negative and positive selection and the drift load at splice sites. Genome Biology and Evolution 6(6): 1437-1447.

3. S. Denisov, M.S. Gelfand (2003) Conservedness of the alternative splicing signal UGCAUG in the human and mouse genomes. Biophysics (Moscow) 48(suppl. 1): 30-35

**Вклад диссертанта в опубликованные работы** по теме диссертации состоит в непосредственном планировании исследований, участии в формулировках задач, теоретической разработке и практической реализации методов, обработке и анализе данных. Во всех трех журнальных публикациях диссертант является первым автором.

Полученные результаты могут быть использованы при чтении спецкурсов на биологических и биоинформатических факультетах ВУЗов, на курсах повышения квалификации биологов. Также, полученные автором результаты и отработанные методические подходы могут служить базисом для проведения последующих исследований по эволюции некодирующих функциональных элементов генома. Несомненно, отдельный интерес представляют исследование молодых сайтов сплайсинга и вызванных их появлением изменений в соответствующих транскриптах. Исследования такого рода проводятся в Институте цитологии и генетики СО РАН, Институте общей генетики РАН, Сколковском институте науки и технологий, а также в научных подразделениях многих федеральных университетов.

На диссертацию поступило 8 отзывов, из них — 5 отзывов на автореферат, все **отзывы положительные**. В отзывах указывается, что не вызывает сомнений актуальность темы рассматриваемой диссертации, а также научная и практическая ценность работы. Диссертация является законченной квалификационной работой, выполненной автором самостоятельно на высоком научном уровне. Исследуется, как устроен отбор на консенсусные и неконсенсусные нуклеотиды при неизменном ландшафте приспособленности. Показано, что на неконсенсусные нуклеотиды действует слабый положительный, а на консенсусные, соответственно, слабый отрицательный отбор. У части сайтов сплайсинга, однако, существует отбор на неконсенсусные нуклеотиды. Сила сайта сплайсинга влияет на силу отбора: на консенсусные нуклеотиды слабых сайтов сплайсинга действует



более сильный отрицательный отбор. На молодые сайты сплайсинга, появившиеся на линии человека после расхождения с макаком, действует в 2-10 раз более сильный отбор, чем на старые сайты сплайсинга (т.е. общие для человека, макака и игрунки). Обнаружено, что силы нуклеотидов в различных позициях сайтов сплайсинга часто взаимно скоррелированы. Отбор против динуклеотида AG есть основная причина ковариаций, наблюдаемых в полипиримидиновом тракте акцепторных сайтов сплайсинга. Эпистаз – наиболее вероятная причина ковариаций в донорном сайте сплайсинга. Как в донорных, так и в акцепторных сайтах сплайсинга действует эпистатический отбор, который усиливает существующие ковариации между нуклеотидами. В работе также исследуется консервативность регулятора сплайсинга UGCAUG. Консервативность гексануклеотидов UGCAUG, встречающиеся в интронах после кассетных экзонов в геномах человека и мыши существенно выше средней консервативности интронов, что говорит об их вероятной функциональности.

Исследования являлись новыми на момент публикации, их достоверность подтверждена последующими работами. Результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями по специальности «03.01.09. - математическая биология, биоинформатика».

Таким образом, диссертационная работа Денисова Степана Владимировича на тему «Отбор и эпистаз в сайтах сплайсинга» является законченным научно-квалификационным исследованием и соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что за последние годы ими было опубликовано большое количество научных работ по сравнительной и эволюционной геномике эукариот и вирусов эукариот.

**В отзыве оппонента** Алексея Владимировича Кочетова, доктора биологических наук, заместителя директора по научной работе Федерального

государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» отмечены достоинства диссертации, а также отмечен ряд недочетов.

1. «Есть несколько неудачных выражений: Стр. 4 «..структура и экспрессия мРНК генов человека..» - есть устойчивые выражения «уровень экспрессии гена», «содержание мРНК», «уровень транскрипции гена», выражение «экспрессия мРНК» лучше не использовать. Стр. 9 Опечатка в слове «Проанализировали». Есть некоторое (небольшое) количество ошибок и грамматических небрежностей (стр. 25 «Они высоко консервативны белков среди многоклеточных», стр. 44 «К группе похожих на *S. cerevisiae* относятся *S. cerevisiae*, ..» ), неудачных выражений (стр. 48 «эффективная численность популяции варьирует вдоль генома», стр 53 «длинный гаплотип») и т.п. . Автору следует определиться, какое склонение русскоязычного названия *Mascas mulatta* использовать: макак (в автореферате) или макака (в диссертационной работе, например – стр. 96).
2. На рис. 14 д-з синие столбики ошибочно названы красными.
3. При выборе в качестве нейтрального контроля нуклеотидной последовательности интрона, следует иметь в виду, что в композиционный состав некодирующих последовательностей на самом деле довольно разный – и по частотам мононуклеотидов, и предпочтительному использованию динуклеотидов. Такие районы, как 5'-НТП, 3'-НТП и интроны могут отличаться достаточно сильно и быть нейтральными контролями друг для друга не всегда могут.

В отзыве отмечено, что «выводы адекватны полученным результатам, хотя в некоторых случаях формулировки представляются излишне категоричными (например, «отбор против динуклеотида AG есть основная причина ковариаций...»)). В отзыве говорится, что «работа производит впечатление хорошего фундаментального исследования, внесшего вклад в решение



важной научной проблемы. Это законченная научно-квалификационная работа, новизна и значимость которой не вызывают сомнений».

**В отзыве оппонента** Алексея Дмитриевича Неверова, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Федерального бюджетного учреждения науки Центрального НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора имеется ряд замечаний.

1. «Стр. 99. "Сила положительного отбора на приобретение консенсусного нуклеотида сильнее у слабых акцепторных сайтов", кажется, что это противоречит данным на рис. 18Б?
2. Стр. 108, таб. 1. В позиции -3 в линии человека отклонение от ожидаемого значения изменения силы сайта равно 10.78 и не является, значимым, в тоже время, значительно меньшие отклонения в других позициях сайта в этой линии имеют высокую значимость. Как это объясняется?
3. Стр. 109, таб. 2. В позиции -4 в конститутивных экзонах наблюдается сильная потеря силы сайта в трех линиях, что означает отдаление сайта от консенсуса в этой позиции (эффект является значимым). Если верить рис. 2, то в этой позиции нет консенсуса, что тогда понимается по "силой" для этой позиции.
4. Раздел 4.1.5., стр. 95. Автор пишет: "метод парсимонии имеет тенденцию недооценивать частоту замен из неконсенсусных нуклеотидов в консенсусные, что и приводит к переоценке силы отрицательного и недооценки силы положительного отбора". Казалось бы, что метод парсимонии должен одинаково недооценивать, по сравнению с методом макс. правдоподобия, частоты замен как из консенсусных, так и неконсенсусных нуклеотидов?
5. Стр. 80. На основании каких соображений пренебрегаются ошибки в нейтральном контроле? Из общих соображений, величина ошибки в контроле не отличается от таковой в данных.
6. Раздел 4.1.4, стр. 89, представлены данные для средней межвидовой консервативности только для неконсенсусных

нуклеотидов. Результаты по консенсусным нуклеотидам нигде не представлены».

Не смотря на сделанные замечания, в отзыве говорится, что диссертационная работа является «законченным самостоятельным исследованием, выполненном на высоком научном и методическом уровне. Значимость и достоверность результатов не вызывают сомнений. Сделанные выводы хорошо обоснованы».

**В отзыве на автореферат Евгения Владимировича Лёушкина,** кандидата биологических наук, научного сотрудника центра молекулярной биологии г. Гейдельберга, Германия (ZMBH) отмечено, что «в последнее десятилетие наблюдается стремительный рост полногеномных исследований, что несомненно помогает в решении многих биологических задач. Однако зачастую такие исследования носят преимущественно описательный характер, увеличивая объём доступных данных, но не углубляя понимания закономерностей в биологии, и, в частности, в эволюции. По этой причине особенно приятно было читать автореферат диссертации С. В. Денисова, посвящённый фундаментальному анализу эволюции сайтов сплайсинга». В целом дана положительная оценка работе и перечислен ряд недочетов. «... в отдельных местах объяснения выглядят несколько запутанными. Например, ” $\#(Z \rightarrow X)$  и  $\#(Z \rightarrow Y)$  – числа замен между нуклеотидом  $Z$  в геноме предка и нуклеотидом  $X$  (или  $Y$ , соответственно) в геноме потомка” на самом деле означает ”число замен нуклеотида  $Z$  в геноме предка на нуклеотид  $X$  (или  $Y$ ) в геноме потомка”. Особенно сложен для понимания параграф про сайт-специфический отбор».

**В отзыве на автореферат Ольги Вячеславовны Калининной,** кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.03 — молекулярная биология, старшего научного сотрудника Института Информатики Общества Макса Планка г. Саарбрюкен, Германия дана положительная оценка работе, существенных замечаний по работе нет.

**В отзыве на автореферат Андрея Владимировича Марахонова,** кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории генетической эпидемиологии Федерального государственного бюджетного



научного учреждения «Медико-генетический научный центр» дана высокая оценка работе. Указывается пожелание более строго следовать используемой терминологии. «К примеру, при обсуждении изменения силы позиций в сайтах сплайсинга иногда используется термин «вес», однако не указывается, что в данном случае этот термин используется как синоним силы позиции». Также делается следующее замечание: «...представляется разумным небольшое обсуждение преимуществ использования частоты производного аллеля для оценки влияния частых в популяции полиморфизмов по сравнению с обычно используемой для этого частоты минорного аллеля». В отзыве указано, что «замечания носят в основном рекомендательный и редакционный характер и не меняют основных выводов работы».

**В отзыве на автореферат Василия Евгеньевича Раменского**, кандидата физико-математических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории геномной инженерии Московского физико-технического института (Государственного университета) дана положительная оценка работы, отмечается «ясность изложения и высокий уровень оформления автореферата». Указывается на «незначительные опечатки, в первую очередь пунктуационные», однако эти замечания «являются исключительно редакционными и не влияют на оценку работы».

**В отзыве на автореферат Виктора Вячеславовича Татарского**, кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России отмечено, что «Автореферат диссертации четко и логично излагает материал диссертации, результаты хорошо визуализированы в таблицах и рисунках. Выводы, полученные в ходе диссертационного исследования, соответствуют поставленным цели и задачам». Указано, что «принципиальных замечаний по автореферату диссертации нет».

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработан и применён** метод детекции положительного и отрицательного отбора в сайтах сплайсинга, а также метод, позволяющий проверять гипотезу о независимости эволюции позиций сайтов сплайсинга;

**доказано** наличие слабого положительного и отрицательного отбора в сайтах сплайсинга;

**впервые показано** существование слабополезных мутаций в сайтах сплайсинга при неизменном ландшафте приспособленности;

**показано**, что на позиции сайтов сплайсинга эпистатически взаимодействуют между собой, соответственно на сайты сплайсинга действует эпистатический отбор;

**показано**, что консервативность регуляторного цис-элемента сплайсинга UGCAUG существенно выше средней консервативности интронов, что говорит об их вероятной функциональности.

**Теоретическая значимость исследования** обоснована тем, что:

систематически исследован отбор, действующий на сайты сплайсинга;

**показано** одними из первых существование слабополезных мутаций при неизменном ландшафте приспособленности;

**впервые показано** действие сильного положительного отбора на молодые сайты сплайсинга;

**впервые исследован** эпистаз и эпистатический отбор в сайтах сплайсинга.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики** подтверждается тем, что:

была предсказана функциональность цис-регуляторного элемента UGCAUG в ряде генов, многие из этих предсказаний подтвердились в последующих экспериментальных исследованиях (проведённых, в частности, методами сайт-направленного мутагенеза).

**Свидетельства достоверности результатов исследования:**

- наличие положительного и отрицательного отбора в сайтах сплайсинга было подтверждено независимо на двух различных филогенетических линиях: на линии *Homo sapiens* (после дивергенции от *Macaca mulatta*) и на линии *Drosophila melanogaster* (после дивергенции от *Drosophila simulans*), что позволяет предположить, что найденные закономерности универсальны для многих эукариот;



- два различных метода восстановления предковых состояний, а также матриц вероятностей переходов дали очень похожие результаты и не повлияли на сделанные выводы о наличии положительного отбора;

- исключение гипермутабельных последовательностей (CpG) не повлияло на полученные результаты, что говорит, что найденные эффекты носят отборный, а не мутационный характер;

- использовано несколько вариантов нейтрального контроля (исключались позиции с phyloP score < 0.6, а также рассматривались короткие интроны *Drosophila melanogaster*), полученные результаты были очень похожи;

- статистические тесты и методы использованы корректно.

**Личный вклад соискателя** состоит в планировании исследований, участии в постановке задач, теоретической разработке и практической реализации методов, анализе данных и написании статей. Результаты, описанные в диссертации, получены автором самостоятельно. В диссертации решены задачи, имеющие значение для развития исследований в области эволюции сайтов сплайсинга и других последовательностей в геноме, находящихся под действием слабого или эпистатического отбора. По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика.

Диссертационный совет пришёл к выводу о том, что диссертация представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, имеющую теоретическое и практическое значение для медицины и биотехнологии. По актуальности, новизне, практической значимости диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2014 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

На заседании 24 апреля 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Денисову Степану Владимировичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 10 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали за - 15 , против - 0, недействительных бюллетеней - 0

Председатель

диссертационного совета Д 002.077.04

д.б.н., профессор

 М.С. Гельфанд

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.077.04

д.б.н., профессор

24 апреля 2017 г.

 Г.И. Рожкова