

ФАНО РОССИИ



**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
(ИОГен РАН)**

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru
http: www.vigg.ru

УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора Института общей
генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
д.б.н. А. М. Кудрявцев



20 марта 2017

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Денисова Степана Владимировича

«Отбор и эпистаз в сайтах сплайсинга»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Актуальность выбранной темы для науки и практики

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования, позволило наряду с полногеномными данными получают полнотранскриптомные данные. Таким образом значительно расширились возможности по изучению альтернативного сплайсинга в том числе появилась возможность изучения изоформ специфичных для различных тканей многоклеточных организмов. Наряду с этим наличие и геномных и транскриптомных последовательностей позволило с высокой точностью локализовать сайты сплайсинга. В результате вопрос, связанный с необходимостью понимания какие механизмы лежат в основе регуляции сплайсинга, приводящей к наличию тканеспецифических изоформ становится всё более и более актуальным. В представленной работе исследуется одна из систем регуляции сплайсинга, а именно система основанная на цис-элементе UGCAUG. Так же немаловажной частью работы является сравнительно-эволюционный анализ сайтов сплайсинга. Автором предлагаются методы, позволяющие оценивать отбор действующий

на сайты сплайсинга, что может быть в перспективе использовано и в других областях биоинформатики и смежных наук.

Диссертационная работа изложена на 166 страницах, построена по стандартной схеме и включает следующие разделы: Введение, в котором также сформулированы актуальность темы, цели и задачи, научная новизна и практическая значимость работы, Обзор литературы, Данные и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Список литературы и Приложения. Работа также включает 27 рисунков, 5 таблиц. Список литературы содержит 218 источников. Приложение содержит 11 рисунков и 2 таблицы.

В обзоре литературных данных (Глава 2) приводятся основные сведения о механизмах альтернативного сплайсинга и его регуляции, разнице в механизмах регуляции у *D. melanogaster* и *H. sapiens*, цис-элементах и транс-факторах регулирующих сплайсинг. Излагаются основные результаты, полученные в ходе сравнительно-эволюционных исследований процессов появления и пропадания интронов, увеличения и уменьшения средней силы сайтов сплайсинга, изменения структурных элементов сплайсосомы. Приводятся гипотеза о миграции сигнала из экзонной части в интронную, основные сведения о макро- и микроэволюции сайтов сплайсинга, описание основных методов применяемых при поиске положительного и отрицательного отбора, а так же основные сведения о эпистазе и эпистатическом отборе. В главе 3 автор приводит описание основных методов и данных используемых при выполнении работы

В главе 4 приводится описание и обсуждение результатов работы. В пункте 4.1. приводится описание специального теста на наличие положительного или отрицательного отбора в сайтах сплайсинга и дается описание основных результатов работы, связанных с изучением отбора в них. Пункт 4.2., посвящен изложению результатов изучения скоррелированной эволюции позиций в сайтах сплайсинга млекопитающих, в пункте 4.3 изложено изучение консервативности цис-регуляторного сайта сплайсинга UGCAUG.

Новизна и значимость основных научных результатов, полученных диссертантом

Диссертационная работа С.В. Денисова носит теоретический характер. Основные результаты, полученные соискателем, таковы:

1. Показано, что на неконсенсусные нуклеотиды действует слабый положительный, а на консенсусные, соответственно, слабый отрицательный отбор ($1 < |4N_e s| < 4$). Однако, для части сайтов сплайсинга, показано, что существует отбор на неконсенсусные нуклеотиды, причем сила сайта сплайсинга влияет на силу отбора: на консенсусные нуклеотиды слабых сайтов сплайсинга действует более сильный отрицательный отбор.
2. Обнаружено, что на молодые сайты сплайсинга, появившиеся на линии человека после расхождения с макакой, действует отбор в 2-10 раз более сильный отбор, чем на старые сайты сплайсинга (т.е. общие для человека, макаки и игрунки).
3. Показано, что в донорных сайтах сплайсинга конститутивных экзонов наблюдается ослабление экзонной части и слабое увеличение силы интронной части сайтов, что согласуется с гипотезой о миграции сигнала из экзонной части в интронную.
4. Показано, что силы нуклеотидов в различных позициях сайтов сплайсинга часто взаимно скоррелированы. Причем в донорных сайтах сплайсинга наблюдаются

положительные ковариации между позициями внутри экзонной и внутри интронной частей и отрицательные – между экзонными и интронными частями, а в полипиримидиновом тракте акцепторных сайтов сплайсинга наблюдается характерный чередующийся характер ковариаций: соседние позиции коварируют отрицательно, через позицию – положительно, через две – отрицательно и т.д.

5. Показано, что отбор против динуклеотида AG есть основная причина ковариаций, наблюдаемых в полипиримидиновом тракте акцепторных сайтов сплайсинга, и эпистаз – наиболее вероятная причина ковариаций в донорном сайте сплайсинга.
6. Обнаружено, что как в донорных, так и в акцепторных сайтах сплайсинга действует эпистатический отбор, который усиливает существующие ковариации между нуклеотидами.
7. Показано, что консервативность гексануклеотидов UGCAUG, встречающихся в интронах после кассетных экзонов в геномах человека и мыши существенно выше средней консервативности интронов, что говорит об их вероятной функциональности.

Работа выполнена с использованием стандартных, хорошо зарекомендовавших себя методов биоинформатики. Результаты диссертации получены автором самостоятельно и впервые, и в качестве трех статей опубликованы в международных рецензируемых журналах *Genome biology and evolution*, *PLoS One* и *Биофизика*.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Разработанные для выполнения данной работы методы могут быть использованы в ряде других областей биоинформатики. А именно разработанный тест на наличие положительного и отрицательного отбора действующего на сайт сплайсинга может послужить основой для подобных тестов для других видов некодирующих белок последовательностей. Так же автором разработан и программно реализован метод, позволяющий оценивать влияние, оказываемое заменами в одних позициях сайтах сплайсинга на замены в других позициях. Опять же этот метод применим для более широкого класса последовательностей, таких как сайты связывания транскрипционных факторов.

Общие замечания

К сожалению диссертация не лишена ряда недостатков:

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.

На стр. 16 диссертации упоминается E-комплекс без объяснения что под ним имеется ввиду.

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.

На стр. 20 диссертации вместо “экзоном” должно быть “экзонов”

Автором вводится обозначение для коэффициента отбора (s), но так же широко встречающиеся обозначения для эффективного размера популяции и частоты мутаций (N_e и μ) даются без предварительной расшифровки.

Заключение

Диссертационная работа С.В. Денисова представляет собой законченное исследование на актуальную тему, проведенное на высоком научном уровне с использованием широкого арсенала современных методов биоинформатики. Работа аккуратно оформлена, написана грамотным языком, сделанные выводы хорошо обоснованы. Автореферат соответствует содержанию диссертации. Полученные результаты имеют важное теоретическое и практическое значение. Работа С.В. Денисова отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Отзыв рассмотрен на расширенном семинаре лаборатории системной биологии и вычислительной генетики ИОГен РАН 15 марта 2017 года, протокол №3.

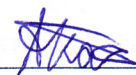
кандидат физико-математических наук,

научный сотрудник

лаборатории системной биологии и вычислительной генетики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института общей генетики им. Н. И. Вавилова

Российской академии наук (ИОГен РАН)

 /Касьянов А.С./

15 марта 2017 года

Подпись научного сотрудника лаборатории системной биологии и вычислительной генетики ИОГен РАН, кандидата физико-математических наук Касьянова Артема Сергеевича удостоверяю.

Зам. директора по научной работе
д.б.н., проф. Серикбай Каримович Абилов

