

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 УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело №\_\_\_\_\_

решение диссертационного совета  
от 15 апреля 2019, протокол № 12

о присуждении Мазину Павлу Владимировичу, гражданину Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Анализ возрастных изменений альтернативного сплайсинга в коре головного мозга высших приматов» по специальности 03.01.09 — Математическая биология, биоинформатика, принята к защите 11 февраля 2019 года, протокол № 6 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 Картеный переулок, д. 19, стр. 1., приказ о создании № 978/нк от 16 декабря 2013 года).

Соискатель Мазин Павел Владимирович, гражданин Российской Федерации, 1985 года рождения, в 2008 году окончил факультет биоинженерии и биоинформатики Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова по специальности «Биоинженерия и биоинформатика». В период подготовки диссертации, с 01.10.2008 по 01.10.2011 обучался в аспирантуре на факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, и с

26.05.2011 года работает в ИППИ РАН в должности и.о. младшего научного сотрудника.

**Диссертация выполнена** в учебно-научном центре «Биоинформатика» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем передачи информации А.А. Харкевича Российской академии наук.

**Научный руководитель** Хайтович Филипп Ефимович, кандидат биологических наук, профессор Сколковского института науки и технологий.

**Официальные оппоненты:**

Самсонова Мария Георгиевна, гражданка РФ, доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией «Научно-исследовательская лаборатория математической биологии и биоинформатики» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Ушаков Вадим Леонидович, гражданин РФ, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела нейрокогнитивных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

дали **положительные** отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** — Федеральное государственно бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук дала **положительное** заключение, подписанное кандидатом физико-математических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории системной биологии и вычислительной генетики ИОГен РАН Касьяновым А.С., и утверждённое доктором биологических наук, профессором Александром Михайловичем Кудрявцевым, директором ИОГен РАН. В заключении указан ряд замечаний:

1. «С содержательной точки зрения наибольшие вопросы вызывает построение статистических моделей. В качестве основной модели для описания покрытия участков генома прочтениями, реализованной в программе SAJR выбрана обобщённая линейная модель, в которой предполагается биноминальное распределение прочтений, поддерживающих и исключающих конкретный сайт сплайсинга. Такие модели в настоящее время считаются недостаточно гибкими, ввиду распространённого в экспериментах по секвенированию нового поколения явления «повышенной дисперсии» (overdispersion) в статистике картированных прочтений. В настоящее время предпочтительными кажутся двупараметрические модели, например, использующие обратное биномиальное распределение.»

2. «Другой вопрос относится к моделированию зависимости от возраста (раздел 5.1.5). В диссертации используется достаточно сложная модель, в которой одной из переменных является квадрат логарифма возраста. В целом, по результатам модель работает достаточно хорошо, но с точки зрения конструирования модели конкретное значение возраста вносит вклад как в линейный, так и в нелинейный член, что по идеи должно делать модель неустойчивой, и отдающей предпочтение то одному, то другому вкладу, в зависимости от случайных факторов.»

3. «Имеется ряд редакционных замечаний. Неудачен вывод З в разделе 5.3. «Возрастная регуляция сплайсинга кодирующих и кассетных не кодирующих белок сегментов консервативна в изучаемых видах. В то же время, количество возраст-зависимых удержанных инtronов существенно больше у человека, чем у других видов». Количество возраст-зависимых удержанных инtronов является одним из результатов регуляции не кодирующих белок сегментов, поэтому эта формулировка противоречива.»

Несмотря на замечания, в отзыве содержится высока оценка научного уровня выполненной работы и отмечено «Диссертационная работа Мазина Павла Владимировича «Анализ возрастных изменений альтернативного спlicingа в коре головного мозга высших приматов» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором решена задача анализа возрастной динамики альтернативного спlicingа у человека и близких видов приматов. Решение этой задачи имеет большое значение для задачи понимания механизмов реализации генетической информации (транскрипция) и механизмов регуляции экспрессии генов, а также задач компьютерной геномики».

**Соискатель имеет 7 статей** в международных рецензируемых журналах, включённых в перечень ВАК, из них 2 статьи по теме диссертации, общим объёмом 27 страниц. Кроме того, соискателем опубликовано 10 тезисов по теме диссертации в материалах российских и международных конференций.

**Публикации по теме диссертации:**

1. **Mazin P**, Xiong J, Liu X, Yan Z, Zhang X, Li M, He L, Somel M, Yuan Y, Phoebe Chen YP, Li N, Hu Y, Fu N, Ning Z, Zeng R, Yang H, Chen W, Gelfand M, Khaitovich P. Widespread splicing changes in human brain development and aging // Mol. Syst. Biol. 2013. T. 9. C. 633-647.
2. **Mazin PV**, Jiang X, Fu N, Han D, Guo M, Gelfand MS, Khaitovich P. Conservation, evolution, and regulation of splicing during prefrontal cortex development in humans, chimpanzees, and macaques // RNA. 2018. T. 24. № 4. С. 585–596.

**Вклад докторанта в опубликованные работы** по теме диссертации состоит в непосредственном планировании исследований, участии в формулировках задач, теоретической разработке и практической реализации методов обработки и анализа данных. В обеих журнальных публикациях докторант является первым автором.

Полученные результаты могут быть использованы при чтении спецкурсов на биологических и биоинформационических факультетах ВУЗов. Кроме того, полученные автором результаты и разработанные методологические подходы могут быть использованы при проведении транскриптомных исследований. Исследования такого рода проводятся в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, Сколковском институте наук и технологий, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной генетики РАН, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт математических проблем биологии РАН, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии гена РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН, ФИЦ биотехнологий РАН, Федеральном государственном бюджетном учреждении "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства", а также в научных подразделениях федеральных университетов.

На диссертацию поступило 5 отзывов на автореферат, все **отзывы положительные**. В отзывах даётся высокая оценка работе и указывается, что диссертационная работа является законченным исследованием, которое вносит существенный вклад в понимание регуляции альтернативного сплайсинга в ходе развития головного мозга приматов.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что за последние годы ими было опубликовано большое количество научных работ по анализу транскриптомов и/или работе головного мозга, в том числе по темам, относящимся к тематике диссертации.

**В отзыве оппонента** Марии Георгиевны Самсоновой, доктора биологических наук, профессора, зав. лабораторией «Научно-исследовательская лаборатория

математической биологии и биоинформатики» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», отмечены следующие недочёты:

1. «З положение (положение 5) обосновано только в первой части утверждения о том, что частота удержания инtronов падает с возрастом в префронтальной коре всех трёх видов. Отрицательная же корреляция между частотой включения инtronов и экспрессией соответствующих генов является лишь косвенным указанием на роль удержания инtronов в возраст–зависимой регуляции уровня экспрессии генов и, поэтому, эта часть положения должна быть переформулирована соответствующим образом.”

2. «Почему в линейную модель зависимости частоты включений сегментов от возраста входит квадратичный член такой зависимости?»

3. «При анализе возрастных изменений в коре и мозжечке человека использовали набор данных НД.1.1 из 6 временных точек. Вместе с тем на рисунке 6 таких точек больше и значения возрастов в них не всегда совпадают с таковыми приведёнными на рисунке ЗА.»

4. «Автор построил модель для предсказания возрастных изменений частоты включений сегментов, предположив, что они пропорциональны линейной комбинации произведений уровней экспрессии факторов сплайсинга и аффинностей соответствующих мотивов. Согласие такой модели с данными низкое – коэффициент корреляции между данными и предсказаниями всего 11%. Насколько в свете этого обосновано суждение автора о том, что обнаруженные в настоящей работе мотивы и факторы действительно отвечают за возрастные изменения частоты включения, а изменения альтернативного сплайсинга можно предсказать, исходя из простых начальных принципов? Как можно изменить

модель с тем, чтобы улучшить её предсказательную способность? Какие экспериментальные проверки возможны для доказательства правильности модели?»

5. «Не совсем понятен смысл рисунка 10В. Каким образом он иллюстрирует что “...основным направлением эволюции средних значений ЧВ в мозге приматов является увеличение альтернативности: частоты включения смещаются от нуля и единицы в направлении 0.5 (рис. 10В).”»

6. «Какая статистика использовалась для демонстрации эволюционной консервативности участков ДНК вблизи возраст–зависимых экзонов, а также фланкирующих их участков?»

7. «Отражает ли высота дуг на рисунках 5 и 8 текста диссертации частоту прочтений, картирующихся на экзон–экзонные границы? Если да, это надо было указать в легендах.»

8. «В виду затруднительности использования максимальной продолжительности жизни для корректировки возрастов в данной работе поправочные коэффициенты для возрастов были вычислены на основании возрастных изменений альтернативного сплайсинга, так, чтобы максимизировать схожесть изменения между видами. Не является ли в таком случае вывод об эволюционной консервативности возрастных изменений альтернативного сплайсинга белок–кодирующих сегментов в мозге закономерным следствием выбранной методики выравнивания возрастов?»

Несмотря на сделанные замечания, в отзыве говорится, что «выполнен нетривиальный анализ больших массивов данных высокопроизводительных экспериментов секвенирования, построены новые математические модели. По теме работы опубликованы две статьи. Все это позволяет рекомендовать автора работы П.В.Мазина для присуждения степени кандидата биологических наук по

специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика, работа полностью удовлетворяет требованиям п. 9 “Положения о порядке присуждения учёных степеней”, утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации. N 842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации N 335 от 21 апреля 2016г., N 478 от 2 августа 2016г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям.»

**В отзыве оппонента Ушакова Вадима Леонидовича, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела нейрокогнитивных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», в целом дана положительная оценка работе, но имеется ряд замечаний и вопросов:**

1. «Для обоснования преимущества представленного метода необходимо было его сравнение с другими методами на одной выборке данных.»
2. «Полученные результаты могут иметь смещённую оценку по причине их не выравненности по полу и национальности»
3. «Представленная выборка генов ограничена и не совсем ясно насколько сделанные выводы по изменению АС с возрастом и межвидовыми факторами можно применить ко всей совокупности генов.»
4. «Не представлен клеточный состав анализируемых образцов, что требует пояснения для сделанных выводов в диссертации относительно состава экспрессирующихся генов.»
5. «На рис. 10 и диаграмме 16 нет погрешностей, поэтому не ясна достоверность выводов по видоспецифичности и возрастным изменениям сплайсинга.»
6. «На стр. 53 не совсем понятно, что происходит в тех генах, которые не взяты в анализ — они не меняли с возрастом АС?»

7. «На стр. 54 не ясно по какому принципу были выбраны 30 сегментов для ПЦР — в чем их уникальность и насколько они могут обобщить сделанный по результатам вывод?»

8. «На рис. 4 и далее нет пояснений как строилась плотность распределения.»

9. Стр. 56 и далее не ясно почему было выбрано 8 паттернов, какая мера была использована для такого выбора и насколько результаты будут устойчивы, если изменить число паттернов.

10. «На рис. 6 не ясно, если ЧВ нормирована, то почему на графике она больше 1.»

11. «Стр. 56 не ясен вывод про 26% и 33% изменений в НД1.1 и в НД1.2 — это противоречит графику на рис. 6.»

12. «Стр. 58 — в выводе про 15% сегментов, имеющих статистически значимые различия в возрастной регуляции АС между двумя регионами мозга не совсем ясно откуда взялась эта цифра и в какой из зон ПФК или КМ они более изменчивы.»

13. «На стр. 72 на рис. 10 странная аббревиатура ПФЦ. Требует пояснения.»

14. «На стр. 74 не ясно почему выбрана величина 80% на основе данных рис. 12, поскольку она может иметь, например, большее значение как видно из рис. 12.»

В отзыве отмечено «диссертационная работа П.В. Мазина посвящена актуальной теме и выполнена на хорошем уровне. Диссертационная работа «Анализ возрастных изменений альтернативного сплайсинга в коре головного мозга высших приматов» представляет собой законченную работу и при ответе соискателя на представленные замечания несомненно соответствует требованиям,

предъявляемым ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации к кандидатским диссертациям, а её автор, Павел Владимирович Мазин несомненно заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 — математическая биология, биоинформатика.».

**В отзыве на автореферат Александра Викторовича Тяхта**, кандидата биологических наук, научного сотрудника Института биологии гена РАН дана положительная оценка диссертации, есть несколько замечаний: «в тексте местами присутствуют пунктуационные ошибки (отсутствие запятых) и опечатки (например на рисунке 9). На странице 4 без расшифровки используется аббревиатура «ФС». Слово «так же» в значении «ещё» пишется слитно. Принципиальные методологические замечания отсутствуют. В легенде к рисунку 10 присутствует формулировка «сила сплайсинга меняется более чем на один бит» - вероятно имеется в виду «сила сайта сплайсинга». В отзыве указывается, что «работа носит законченный характер, обладает актуальностью, новизной, теоретической и практической значимостью. Выводы, сделанные автором, полностью соответствуют результатам <...> диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание кандидата биологических наук».

**В отзыве на автореферат Олега Александровича Гусева**, кандидата биологических наук, руководителя НИЛ «Экстремальная биология» Института фундаментальной медицины и биологии КФУ дана положительная оценка работы, в качестве замечания указывается, что «автор в работе не коснулся вопроса соотношения сайтов инициации транскрипции, включая видоспецифичные промоторы, с разнообразием сплайсинг-вариантов» однако отмечается, что «это никак не умаляет ценности работы».

**В отзыве на автореферат Марии Андреевны Простовой**, кандидата биологических наук, научного сотрудника отдела молекулярной генетики клетки Института молекулярной генетики РАН дана положительная оценка работы, указано, что «автореферат содержит небольшое количество опечаток и незначительные помарки оформления, что не умаляет общее хорошее впечатление от работы».

**В отзыве на автореферат Ольги Вячеславовны Калининой**, кандидата биологических наук, профессора Университета Земли Саар (Германия) даётся высока оценка диссертационной работе, однако отмечается, что «к несущественным недостаткам автореферата можно отнести встречающиеся в нем опечатки и небрежности. Например, на стр. 4 использовано сокращение «ФС» без расшифровки. Мне не удалось найти в автореферате расшифровки этой аббревиатуры, но я могу догадаться, что это означает «фактор сплайсинга». С другой стороны, использованное на стр. 6 сокращение «МСНП» мне так и не удалось расшифровать. Однако эти замечания ни в коей мере не умаляют достоинств работы.»

**В отзыве на автореферат Юлии Анатольевной Медведевой**, кандидата биологических наук, руководителя группы регуляторной транскриптомики и эпигеномики ФИЦ биотехнологий РАН дана положительная оценка диссертационной работе. В отзыве говориться, что «хотелось бы увидеть более подробный анализ генов, для которых АС демонстрирует наибольшую межвидовую или межвозрастную вариативность (в автореферате в этом контексте проанализированы только два гена). Как мне кажется, при разработке подобных моделей и сложных систем критически важно понимать, что реальные гены, предсказанные моделями действительно участвуют в нейрогенезе. К тому же именно такие гены могли бы быть кандидатами для экспериментальной

валидации». Однако отмечено, что «указанное замечание никак не умаляет ценности проведённого исследования».

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработан и применён** метод анализа статистического альтернативного сплайсинга на основании данных РНК-Сек;

**впервые показано**, что сплайсинг более чем тысячи генов меняется в ходе развития мозга человека;

**показано**, что частота удержания инtronов преимущественно падает в ходе развития мозга человека;

**разработан и применён** метод создания ортологичных экзон-экзонных аннотаций для близкородственных видов;

**разработан и применён** метод соотнесения возрастов между видами на основании возрастных изменений альтернативного сплайсинга;

**показано**, что в мозгу приматов межвидовые отличия альтернативного сплайсинга доминируют над возрастными различиями;

**показано**, что изменения альтернативного сплайсинга, наблюдаемые в ходе развития мозга приматов, очень схожи у человека, шимпанзе и макаки;

**показано**, что большая часть высокоамплитудных межвидовых отличий сплайсинга могут быть объяснены различиями в нуклеотидных последовательностях соответствующих сайтов сплайсинга;

**найдены** регуляторные мотивы и связывающие их факторы сплайсинга, вероятно отвечающие за регуляцию альтернативного сплайсинга в ходе развития мозга приматов.

Разработанные методы могут быть применены при анализе альтернативного сплайсинга в других экспериментальных системах, полученные знания о изменениях альтернативного сплайсинга в ходе развития мозга приматов могут быть использованы при изучении механизма различных заболеваний мозга, связанных с нарушением сплайсинга.

### **Свидетельства достоверности** результатов исследования:

- в анализе использовалось несколько независимых наборов данных, отличающихся как донорами тканей, так и методами секвенирования. Использование доноров ткани из разных этнических групп и обоих полов позволяет говорить о том, что обнаруженные изменения сплайсинга являются общими для всех представителей вида человек;
- достоверность метода SAJR подтверждается независимым экспериментом — полуколичественной ПЦР;
- возрастные изменения альтернативного сплайсинга в мозгу человека были валидированы на дополнительном наборе данных, дополнительно они подтверждаются консервативностью указанных изменений в других изучаемых видах;
- обнаруженные межвидовые отличия подтверждаются при использовании дополнительного набора данных.

**Личный вклад соискателя** состоит в планировании исследований, участии в постановке задач, теоретической разработке и практической реализации методов анализа данных и в написании статей. Результаты, описанные в диссертации, получены автором самостоятельно. В диссертации решены задачи, имеющие значение для развития исследований, направленных на дальнейшее изучение развития мозга человека и роли альтернативного сплайсинга в таковом развитии.

По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности «03.01.09 — математическая биология, биоинформатика».

Диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация представляет собой завершённое научное исследование. По актуальности, новизне, практической значимости диссертация соответствует требованиям установленным «Положением о порядке присуждения учёных степеней», утверждённым постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

На заседании 15 апреля 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Мазину Павлу Владимировичу учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 — математическая биология, биоинформатика.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 11 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состава совета проголосовали: за — 16; против — 0; недействительных бюллетеней - 0.

Председатель

диссертационного совета Д 002.077.04

д.б.н., профессор



М.С. Гельфанд

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 002.077.04

д.б.н., профессор

15 апреля 2019 г.

Г.И. Рожкова