

Отзыв официального оппонента о диссертационной работе

Мазина Павла Владимировича

«Анализ возрастных изменений альтернативного сплайсинга в коре головного мозга высших приматов»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

Диссертационная работа Мазина Павла Владимировича посвящена изучению изменений альтернативного сплайсинга в ходе развития головного мозга человека, шимпанзе и макаки. Благодаря развитию технологий массового секвенирования, в последние десять лет стало понятно, что альтернативный сплайсинг играет существенную роль в развитии многих тканей и органов, а его нарушения часто ведут к заболеваниям. Особенно заметную роль альтернативный сплайсинг играет в работе мозга. Человек отличается от других приматов сложным социальным поведением и когнитивными способностями — функциями за которые отвечает мозг. Поэтому изучение роли альтернативного сплайсинга в развитии мозга человека и сравнение человека с другими приматами является актуальной задачей, решение которой позволит лучше понять как нормальное функционирование мозга, так и природу заболеваний нервной системы.

В работе представлен новый алгоритм анализа альтернативного сплайсинга и впервые проведён полногеномный анализ изменений альтернативного сплайсинга в ходе развития мозга приматов, эти результаты обладают несомненной научной новизной.

Объем работы составляет 105 страниц, она состоит из введения, обзора литературы, трёх глав с результатами работы, выводов, библиографии и приложений. Диссертация включает 23 рисунка, библиография содержит 163 наименования. По материалам диссертации опубликованы две статьи в ведущих международных журналах, результаты работы представлены на 10 международных и российских конференциях.

Диссертационная работа П.В. Мазина представляет из себя три исследования последовательно решающих поставленную задачу, изложенных в главах с третьей по пятую.

В третьей главе описывается метод SAJR предназначенный для анализа альтернативного сплайсинга на основании данных массового секвенирования РНК. Метод разбивает каждый ген на сегменты — наименьшие участки гена могущие подвергаться независимому альтернативному сплайсингу и вычисляет для каждого сегмента и частоту включения (долю транскриптов включающих данный сегмент) в каждом биологическом

образце. SAJR использует информацию о прочтениях картируемых на экзон-экзонную границу для подтверждения исключения сегментов из транскриптов, обобщенные линейные модели для работы с сложными экспериментальными дизайнами и тест на квази-правдоподобие для учета биологической вариабельности. В работе показано, что SAJR дает устойчивые результаты, воспроизводимые на независимых наборах данных. Также результаты SAJR подтверждаются принципиально другим экспериментальным методом — ПЦР.

Четвёртая глава посвящена применению метода SAJR для анализа изменений альтернативного сплайсинга в ходе развития головного мозга человека. В работе показано, что более 10% генов экспрессирующихся в мозге человека меняют сплайсинг в ходе развития. Наиболее популярным паттерном изменения альтернативного сплайсинга является убывание частоты включения с возрастом, при этом удержанные интроны следуют этому паттерну чаще, чем кассетные экзоны. В работе также производится сравнение альтернативного сплайсинга между префронтальной корой головного мозга и корой мозжечка. Хотя большая часть изменений наблюдаемых в ходе развития этих двух регионов мозга схожи, в 15% генов наблюдаются различия.

В пятой главе диссертации производится сравнение изменений альтернативного сплайсинга в ходе развития мозга человека, шимпанзе и макаки. П.В. Мазин разрабатывает оригинальный подход, позволяющий ему провести сбалансированный анализ всех трех видов, несмотря на существенные отличия качества геномной аннотации. Оказывается, что несмотря на высокие межвидовые отличия, регуляция сплайсинга в ходе развития мозга сильно консервативна в изучаемых видах. В работе удаётся найти отличия в нуклеотидной последовательности сайтов сплайсинга разных видов, отвечающие за межвидовые отличия альтернативного сплайсинга для большинства высокоамплитудных отличий. При помощи анализа регуляторных последовательностей, найдены вероятные факторы сплайсинга отвечающие за наблюдаемые возрастные изменения.

Обоснованность положений выносимых на защиту

Первое положение выносимое на защиту посвящено разработке метода SAJR и рассмотрено в третьей главе и, частично в четвертой, второе положение касается изменений сплайсинга в в ходе развития мозга человека и рассмотрено в четвёртой главе. Положения 3-5 рассмотрены в пятой главе. Все положения выносимые на защиту представлены результатами, для их окончательного обоснования требуется ответ соискателя на ряд замечаний.

Замечания

Есть ряд замечаний к сделанным в работе выводам:

1. Для обоснования преимущества представленного метода необходимо было его сравнение с другими методами на одной выборке данных.
2. Полученные результаты могут иметь смещенную 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 видоспецифичным и возрастным изменениям сплайсинга.

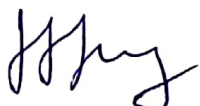
Есть ряд замечаний по оформлению диссертации:

1. На стр. 53 не совсем понятно что происходит в тех генах, которые не взяты в анализ – они не меняли с возрастом АС?
2. 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?
3. На рис. 4 и далее нет пояснения как строилась плотность распределения.
4. 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.
5. На рис. 6 не ясно, если ЧВ нормирована, то почему на графике она больше 1.
6. Стр. 56 не ясен вывод про 26% и 33% изменений в НД1.1 и в НД1.2 – это противоречит графику на рис. 6.
7. 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.
8. На стр. 72 на рис. 10 странная аббревиатура ПФЦ. Требуется пояснения.
9. 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.

Заключение. 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 ее автор, Павел Владимирович Мазин несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 — математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент

 29 марта 2019г.

Ушаков Вадим Леонидович,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Отдела нейрокогнитивных технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Эл. почта: tiuq@yandex.ru

Тел.: 89169284934

Павел Мазин
секретарь НИИ «Курчатовский институт»



Ушаков В.А.