

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

Изучение организации транскриптома мозга имеет важнейшее значение для понимания его функционирования в норме и патологии. Хорошим инструментом в исследовании этой проблемы является эволюционный подход, поскольку несмотря на большое анатомическое и генетическое сходство человека и высших приматов, таких, как шимпанзе, люди сильно отличаются от последних в социальном поведении и когнитивных способностях. Поэтому сравнительный анализ транскриптома мозга человека и других приматов может помочь понять как функционирует мозг в норме и природу различных нервных расстройств. Важно отметить, что анализ транскриптома эукариот, и особенно человека, осложняется альтернативным сплайсингом транскриптов большинства генов, который в нервной ткани высокоспецифичен. Изучение альтернативного сплайсинга стало возможным благодаря появлению методов секвенирования нового поколения, и является нетривиальной задачей в силу необходимости разработки специальных биоинформатических программ для картирования интрон-экзонных границ. Таким образом в диссертационной работе П.В.Мазина решается сложнейшая и очень важная задача систематического исследования возрастных изменений сплайсинга в мозге человека и сравнения их с таковыми у приматов.

В представленной диссертационной работе эта проблема решается последовательно: сначала автором изучены возрастные изменения в мозге человека, а затем проведен сравнительный анализ альтернативного сплайсинга в мозге приматов. Такой подход логичен и оправдан: сначала продемонстрировано, что в ходе развития мозжечка и префронтальной коры мозга человека меняется альтернативный сплайсинг сотен генов, а затем убедительно доказана эволюционная консервативность таких изменений путем сравнения альтернативного сплайсинга генов у человека, шимпанзе и макаки. Использованные автором наборы данных репрезентативны и достаточны для получения статистически достоверных результатов и заключений.

Научная новизна работы состоит в получении пионерских результатов о возрастных изменениях сплайсинга в мозге человека в сравнении с таковыми в мозге приматов, а

также в разработке и программной реализации нового алгоритма анализа альтернативного сплайсинга, обладающего рядом преимуществ по сравнению с аналогичными алгоритмами.

Работа изложена на 105 страницах и состоит из введения, обзора литературы, трёх глав, выводов, библиографии и приложений. Диссертация включает 23 рисунка, библиография содержит 163 наименования. По материалам диссертации опубликованы две статьи в высокорейтинговых международных журналах, результаты работы представлены на 10 международных и российских конференциях.

Структура работы соответствует поставленным задачам. Изложение результатов работы предваряется обзором литературы. В нем автор рассматривает механизмы регуляции биосинтеза РНК у эукариот, методы массового анализа транскриптома, и особое внимание уделяет обобщению данных по транскриптому мозга человека и приматов.

Результаты работы изложены в трех главах. Первая из них (глава 3 диссертации) посвящена разработке метода альтернативного сплайсинга. Автором разработан новый метод SAJR для количественного анализа альтернативного сплайсинга, исходя из данных массового секвенирования РНК (РНК-Сек). Метод позволяет определить частоты включения альтернативных сегментов в мРНК и сравнить частоты включения между несколькими образцами. Программа обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами: позволяет учитывать биологическую вариабельность, подходит для сложных экспериментальных дизайнов, использует информацию о прочтениях РНК, которые картируются на экзон-экзонную границу. В диссертации убедительно доказано, что результаты SAJR устойчивы и воспроизводятся на независимо полученных данных РНК-Сек, а также данных, полученных принципиально другим экспериментальным методом — полуколичественной полимеразной цепной реакцией.

В четвертой главе диссертации исследованы возрастные изменения сплайсинга в мозге человека. Показано, что в ходе развития мозжечка и префронтальной коры мозга человека меняется альтернативный сплайсинг сотен генов, причем большая часть изменений приходится на период старения. При этом, хотя большая часть изменений происходит одинаково в обеих областях мозга, около 15% генов с возраст-зависимым сплайсингом ведут себя по-разному в коре и мозжечке. Интересно то, что автору удалось выделить несколько различных паттернов зависимости альтернативного сплайсинга от возраста, которые хорошо воспроизводятся как между наборами данных, так и между двумя регионами мозга. Наиболее популярным паттерном является убывание частоты

включения альтернативных сегментов с возрастом и обогащение таких сегментов удержанными интронами.

По результатам, изложенным в главах 3 и 4, сформулированы два положения, выносимых на защиту. Первое касается разработки метода SAJR и проверки его устойчивости и воспроизводимости. Это положение, как и второе об возрастных изменениях альтернативного сплайсинга в мозжечке и префронтальной коре мозга человека обоснованы.

Пятая глава посвящена сравнительному анализу возрастных изменений альтернативного сплайсинга в мозге человека и других приматов – макаки и шимпанзе. При этом в силу разницы в средней продолжительности жизни этих видов для возможности сопоставления возрастных изменений у разных видов автору пришлось решить нетривиальную задачу – разработать сбалансированный метод, позволяющий сравнивать альтернативный сплайсинг в нескольких видах. 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. Такой подход изящен, он позволил автору привести все возрасты шимпанзе и макаки к возрастам человека при помощи вычисленных поправочных коэффициентов и установить две чрезвычайно важные общие закономерности. Во-первых, оказалось, что возрастные изменения альтернативного сплайсинга белок-кодирующих сегментов в мозге высоко консервативны. Найдены вероятные регуляторные мотивы и идентифицированы связывающиеся с ними факторы сплайсинга. Получен очень интересный результат: показано, что межвидовые отличия в последовательностях сайтов связывания сплайсосомы (сайтов сплайсинга) объясняют около 20% всех межвидовых отличий, а в случае высоко-амплитудных изменений, эта доля увеличивается до 80%. Во-вторых, показано, что частота удержания интронов падает с возрастом в префронтальной коре всех трех изученных видов и обнаружена отрицательная корреляция между частотой удержания интронов и экспрессией соответствующих генов, что является косвенным указанием на существенную роль удержания интронов в возраст-зависимой регуляции экспрессии генов.

К этой части работы относятся три положения (4 –5). Из них первые два – о разработке метода сравнения альтернативного сплайсинга у разных видов и о консервативности возрастных изменений обоснованы и не вызывают возражений, в то время как третье положение (положение 5) обосновано только в первой части утверждения о том, что частота удержания интронов падает с возрастом в

префронтальной коре всех трех видов. Отрицательная же корреляция между частотой включения интронов и экспрессией соответствующих генов является лишь косвенным указанием на роль удержания интронов в возраст-зависимой регуляции уровня экспрессии генов и, поэтому, эта часть положения должна быть переформулирована соответствующим образом.

По работе есть несколько существенных вопросов и замечаний:

1. Почему в линейную модель зависимости частоты включений сегментов от возраста входит квадратичный член такой зависимости?
2. 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, приведенными на рисунке 3А.
3. 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 ее предсказательную способность? Какие экспериментальные проверки возможны для доказательства правильности модели?
4. 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).”

5. Какая статистика использовалась для демонстрации эволюционной консервативности участков ДНК вблизи возраст–зависимых экзонов, а также фланкирующих их участков?
6. 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.
7. 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?

Высказанные замечания и вопросы не умаляют общего благоприятного впечатления от работы и не снижают ее научной значимости.

**Заключение.** Диссертационная работа П.В.Мазина посвящена актуальной теме – изучению и сравнению возрастных изменений альтернативного сплайсинга в мозге человека и других высших приматов. Реализация этой задачи оказалась возможной благодаря разработке автором двух оригинальных методов – метода и алгоритма для количественного анализа альтернативного сплайсинга и метода корректировки возрастов разных видов на основании возрастных изменений альтернативного сплайсинга. 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 ученых степеней”, утвержденного

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.

Профессор кафедры Прикладная математика  
и заведующая лабораторией  
Математическая биология и  
биоинформатика ИПИМ Санкт-Петербургского  
политехнического университета  
Петра Великого

д.б.н. Мария Георгиевна Самсонова

