

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.077.04 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 07 октября 2019, протокол № 20

о присуждении Марии Александровне Андриановой, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Характеристики точечного мутагенеза в раковых клетках человека» по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика **принята к защите** 22 июля 2019 года, протокол №18, диссертационным советом Д002.077.04 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт 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 Мария Александровна Андрианова, 1990 года рождения, в 2012 году окончила с отличием факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по специальности «Биоинженерия и биоинформатика». После окончания университета с 01.10.2012 по 01.10.2015 обучалась в аспирантуре на факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова по специальности «математическая биология, биоинформатика». В период подготовки диссертации с 01.10.2012 обучалась в аспирантуре на факультете

биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, работала с января 2011 по декабрь 2014 в должности старшего лаборанта лаборатории эволюционной геномики факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, затем с января 2015 по настоящее время в должности и.о. младшего научного сотрудника ИППИ РАН, а с октября 2017 по настоящее время в должности м.н.с. Сколковского Института Науки и Технологий.

Диссертация выполнена в лаборатории №14 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук (ИППИ РАН).

Научный руководитель – Георгий Александрович Базыкин, доктор биологических наук, заведующий Лаборатории №14 ИППИ РАН.

Официальные оппоненты:

Имянитов Евгений Наумович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий научным отделом биологии опухолевого роста, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Василий Евгеньевич Раменский, кандидат физико-математических наук, Руководитель Лаборатории геномной и медицинской биоинформатики, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН) **в своем положительном заключении**, подписанном кандидатом физико-математических наук, с.н.с. лаборатории системной биологии и вычислительной генетики Александром Владимировичем Фаворовым и **утвержденном** заместителем директора по научной работе ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН,

кандидатом биологических наук Сергеем Александровичем Брускиным **отметила** актуальность темы диссертации, высокую степень новизны и значимость полученных результатов, дала рекомендации по их практическому использованию. Отмечено, что в тексте диссертации содержится ряд недочетов в оформлении рисунков. Кроме того, заключение содержит ряд замечаний и вопросов:

- 1) Красивая формула 1, сводящая результаты трёх разных экспериментов и неизвестную величину асимметрии мутационной активности полимераз ϵ и δ в одно уравнение, аннотирована слишком кратко, чтобы быть очевидной.
- 2) В работе несколько раз приведена подпись APOBEC (2 и 13 по COSMIC) и не упомянуто, что по распространённой версии, признаком активности является не только перепредставленность этого мутационного контекста, но и его пространственная кластеризация (цепочки замен).
- 3) При ссылках на раздел подписей базы данных COSMIC лучше приводить дату обращения к базе. К сожалению, этот раздел COSMIC не синхронизирован с версиями остальной базы данных и имеет свойство иногда изменяться без какой бы то ни было документации.
- 4) В разделе 3.2.8 исследуется доля мутаций под положительным отбором в ультрамутабельных и немутабельных глиобластомах. Не может ли быть такого, что на самом деле отношения частот мутаций-драйверов, находящихся под положительным отбором и остальных мутаций (пассажиры) совпадают, но при малом абсолютном числе мутаций в немутабельных раках мутации-пассажиры статистически хуже детектируются.
- 5) В главе 5 при исследовании изменений активности мутационного процесса во времени учитывается ли тот факт, что некоторые опухоли могут быть очень агрессивными и не иметь поздних клонов по причине быстрой летальности этих типов рака?

Несмотря на описанные выше вопросы и замечания, в отзыве указывается, что работа «представляет собой законченное исследование на актуальную тему, проведенное на высоком научном уровне», отвечает требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ее автор, несомненно, **заслуживает присуждения** ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

В отзыве оппонента **д.м.н. Е.Н. Имянитова**, давшего высокую общую оценку работе, имеются замечания редакционного характера:

1. В тексте диссертации имеются многочисленные стилистические недоразумения, отражающие формальный подход к переводу текстов с английского языка. Местами автор злоупотребляет сложными и повторяющимися грамматическими конструкциями, что сильно затрудняет понимание и без того непростой сути экспериментов.
2. Не совсем понятно, в чем разница терминов «скорость мутирования» и «частота мутаций».
3. Для оценки потенциальной патогенности мутаций автор полагается на инструмент PolyPhen-2, что на сегодняшний день, не является «золотым стандартом»; для анализа вариантов с неясным значением рекомендуется сочетать несколько программ, например, созданные на основе машинного обучения и комбинированные предикторы (например, CADD, FATНММ или MutationTaster).
3. Не все использованные сокращения расшифрованы в специальном списке, что создает неудобство при чтении работы.

Несмотря на замечания, оппонент указывает, что диссертация «производит отличное впечатление благодаря ясности и логичности изложения, высокому методическому уровню выполненных исследований, изобретательности и тщательности анализа данных. Впечатляет также научная значимость сделанных выводов. Принципиальных замечаний по диссертации

нет. Имеющиеся замечания носят редакционный характер и не умаляют ценности работы».

В отзыве **оппонента к.ф.-м.н. В.Е. Раменского** дана высокая общая оценка работы, отмечено разнообразие использованных в работе методов и данных и большой объем полученных результатов. Отзыв содержит ряд замечаний и вопросов:

- 1) Глава 1. В пункте 1.2 анонсировано обсуждение в пункте 1.4 различий в числе и типах ошибок на лидирующей и отстающей цепях, однако его там нет, возможно, в силу ошибки нумерации пунктов. Асимметрия между мутационными процессами в лидирующей и отстающей цепях ДНК (т.наз. репликационная асимметрия) весьма кратко описывается в пункте 1.6. Поскольку изучение работы системы репарации на лидирующей и отстающей цепях является одним из важных результатов данной работы (Глава 2), более подробное описание текущих представлений о репликационной асимметрии в Главе 1 было бы весьма уместно.
- 2) Глава 2. В пункте 2.1.1 («Мутационные данные») дано краткое и самое общее описание использованных данных из различных источников без каких-либо цифр. Пункт 2.1.2 с описанием методики определения соматических мутаций в ультрамутабельных раках смущает краткостью (две с половиной строки). Пункты 2.1.3 и 2.1.4 описывают различные методы определения того, как реплицируется референтная цепь ДНК в данной позиции генома – как лидирующая или отстающая – по производной времени репликации и по секвенированию фрагментов Оказаки, соответственно. При чтении этого раздела непонятно, каким образом результаты этих методов далее используются совместно, насколько они согласуются.
- 3) Глава 3. Метод, кратко описанный в пункте 3.1.10 («Оценка доли мутаций под положительным отбором в генах-супрессорах»), вызывает некоторые вопросы. В частности, в явном виде не сформулировано критически

важное предположение о том, что избыток вредных мутаций является признаком действия положительного отбора, а не ослабления стабилизирующего, именно в силу специфики генов-супрессоров.

- 4) Глава 5. Лаконизм в описании методической части (Например, пункт 5.1.1: «Мы получили данные по мутациям и файлы в формате bam из базы данных TCGA», без цифр). Ошибка в нумерации (4.2.2 вместо 5.2.2). В отзыве отмечается, что «требовательный читатель также обнаружит в тексте работы некоторую небрежность изложения», однако указано, что «описанные выше недостатки текста работы, очевидно, объясняются необходимостью вместить очень много информации в ограниченный по объему текст».

Указано, что замечания «не снижают научный уровень и практическую ценность рецензируемой работы».

На все вопросы и замечания диссертантом были даны исчерпывающие ответы.

Соискатель имеет 9 статей в рецензируемых российских и международных журналах, входящих в основные библиометрические базы данных (PubMed, WoS и Scopus), из них **3 статьи** по теме диссертации, общим объемом 30 страниц. Кроме того, соискателем по теме диссертации опубликовано 2 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Публикации по теме диссертации:

1. Bonilla X, Parmentier L, King B, Bezrukov F, Kaya G, Zoete V, Seplyarskiy VB, Sharpe HJ, McKee T, Letourneau A, Ribaux PG, Popadin K, Basset-Seguin N, Chaabene RB, Andrianova MA, Guipponi M, Garieri M, Verdant C, Grosdemange K, Sumara O, Eilers M, Aifantis I, Michielin O, de Sauvage FJ, Antonarakis SE, Nikolaev SI. Genomic analysis identifies new drivers and progression pathways in skin basal cell carcinoma // Nature Genetics. 2016. Vol 48, №4. P. 398-406.

2. Andrianova MA, Chetan GK, Sibin MK, Mckee T, Merkler D, Narasinga RK, Ribaux P, Blouin JL, Makrythanasis P, Seplyarskiy VB, Antonarakis SE, Nikolaev

SI. Germline PMS2 and somatic POLE exonuclease mutations cause hypermutability of the leading DNA strand in biallelic mismatch repair deficiency syndrome brain tumours // Journal of Pathology. 2017. Vol 243, № 3. P. 331-341.

3. Andrianova MA, Bazykin GA, Nikolaev SI, Seplyarskiy VB. Human mismatch repair system balances mutation rates between strands by removing more mismatches from the lagging strand // Genome Research. 2017. Vol 27, №8. P. 1336-1343.

Вклад диссертанта в опубликованные работы по теме диссертации состоит в планировании исследований, участии в постановке задачи, разработке подходов к ее решению, и написании текста статей. В двух из трех журнальных статьях диссертант является первым автором. Из третьей статьи в диссертацию включены только анализы, в планировании и осуществлении которых диссертант принимал непосредственное участие.

На автореферат диссертации поступили отзывы от:

1. **Ивана Владимировича Кулаковского**, д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН Института молекулярной биологии РАН

2. **Степана Владимировича Денисова**, к.б.н., научный сотрудник Сколковского института науки и технологий

3. **Екатерины Евгеньевны Храмеевой**, к.б.н., старший преподаватель Сколковского института науки и технологий

4. **Юлии Анатольевны Медведевой**, к.б.н., руководитель группы регуляторной транскриптомики и эпигеномики ФИЦ биотехнологий РАН

В отзывах отмечается хорошее оформление автореферата и понятность языка изложения, а также то, что работа выполнена на высоком методическом уровне, а теоретическая и практическая значимость результатов не вызывает сомнений. Авторы всех отзывов считают диссертацию соответствующей требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а соискателя – заслуживающим присуждения ученой степени по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

Замечания в отзывах на автореферат:

В отзыве **И.В. Кулаковского** отмечается наличие неудачных стилистических оборотов, например, на стр.17 «коротко говоря, мы подсчитывали», «отсутствие эффекта ... может быть связано со слабым эффектом».

В отзыве **Ю.А. Медведевой** содержится одно замечание: «Когда в качестве мутационной подписи в определенных условиях обнаруживается замена C>T, особенно в контексте CpG, возникает вопрос о роли метилирования ДНК в этом процессе. Известно, что метилцитозин значительно чаще мутирует в тимин, причем частоты мутаций, видимо, также зависят от локализации относительно, например, CpG островков. К сожалению, метилцитозин неравномерно распределен по геному и экзому, кроме того, при раковых трансформациях довольно часто профиль этого распределения значительно меняется. Поэтому было бы полезно учитывать этот фактор в работе.»

Отзыв **С.В. Денисова** содержит ряд технических замечаний и несколько вопросов:

1. Была ли инактивирована система репарации в образцах с мутированными полимеразами и сколько всего было образцов?
2. Стоило сопроводить рисунком или пояснить откуда следует формула (1) на стр.12.
3. Судя по рис.3 мутационная подпись полимеразы эпсилон с инактивированным экзонуклеазным доменом похожа на таковую у интактных полимераз, что само по себе нетривиально. Верно ли это и есть ли какие-то дополнительные свидетельства в пользу или против этого утверждения?
4. Имеются также технические замечания. На рис.1 звездочками указаны р-значения, однако не понятно была ли сделана поправка на множественное тестирование.
5. На стр. 14 рассчитывается число мутаций на геном, при этом неясно был ли выбран какой-то порог отсечения по частоте

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован опубликованными ими работами по вопросам биоинформатики и онкологии, в том числе по темам, относящимся к тематике диссертации, и безусловной компетентностью в биоинформатических исследованиях.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

показано, что полимеразы дельта вызывает большее число неправильно спаренных нуклеотидов при репликации отстающей цепи ДНК, чем полимеразы эpsilon при репликации лидирующей цепи. Система репарации неправильно спаренных нуклеотидов компенсирует различие в скоростях мутирования между цепями, удаляя примерно в 3 раза больше повреждений на отстающей цепи ДНК;

показано, что анализ мутационного спектра и мутационной асимметрии может быть применен для уточнения молекулярного механизма опухоли. В частности, **показано,** что в двух исследованных случаях детских глиобластом ультрамутабельный фенотип опухолей объясняется: 1) накоплением большого числа повреждений на лидирующей цепи ДНК; 2) невозможностью репарации данных ошибок из-за инактивации системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов;

разработан и применен статистический тест для оценки доли мутаций под положительным отбором;

установлено, что доля мутаций, характерных для УФ, в базальноклеточной карциноме выше, чем в меланоме и эффективность репарации таких мутаций с помощью TC-NER также выше в базальноклеточной карциноме;

установлено, что мутации C→A в базальноклеточной карциноме являются преимущественно мутациями окисления гуанина, в то время как в меланоме представляют собой смесь мутаций окисления гуанина и мутаций цитозина под действием УФ;

показано, что доля мутаций, вызванных определённым мутационным процессом, может изменяться в ходе развития раковой опухоли. Изменение активности мутационных процессов влияет не только на особенности мутационного спектра, но и на распределение мутаций вдоль генома и между цепями ДНК.

Теоретическая значимость исследования обусловлена тем, что полученные в данной работе результаты описывают новые аспекты накопления и исправления повреждений ДНК в клетках раковых опухолей. Подробное изучение репликационной асимметрии позволило показать различия в склонности основных репликативных полимераз к неправильному спариванию нуклеотидов, а также различия в эффективности работы системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов на лидирующей и отстающей цепях ДНК. Изучение ультрамутабельных глиобластом не только позволило более точно описать механизм возникновения данного фенотипа, но и дало возможность изучить особенности положительного отбора в таких опухолях. Описание мутационных особенностей базальноклеточной карциномы выявило отличие данного типа рака от другого рака кожи, меланомы. Проведенные исследования также позволили показать изменения спектров мутирования и особенностей распределения мутаций по геному в процессе развития раковой опухоли в результате изменения активностей различных мутационных процессов.

В ходе работы использованы современные методы вычислительной биологии и биоинформатики. **Достоверность и воспроизводимость результатов** исследования обеспечены тщательным документированием использованных методов и открытой доступностью промежуточных результатов, согласованностью результатов с ранее опубликованными научными работами. Результаты опубликованы в профильных международных журналах со строгим рецензированием.

С точки зрения **практической значимости** работа демонстрирует, как подробный мутационный анализ может быть использован для уточнения механизмов развития опухоли в новых раковых образцах или подтипах рака.

Исследование изменения мутационных процессов в ходе развития раковой опухоли может применяться для поиска субклональных драйверных мутаций, поскольку помогает правильно построить модель, описывающую распределение мутаций по геному в исследуемый момент времени. Результаты диссертации могут быть использованы при проведении научных исследований в области молекулярной медицины, физиологии, молекулярной биологии и биоинформатики.

Личный вклад соискателя состоит в планировании исследований, участии в постановке задачи, разработке подходов к ее решению, планировании и проведении вычислительных исследований, и написании статей. Представленные в диссертации результаты получены автором лично или при его непосредственном участии. Работа обладает внутренним единством, цельным изложением и внутренне непротиворечивыми выводами. По своему содержанию диссертация отвечает паспорту специальности «03.01.09 – математическая биология, биоинформатика».

Диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация представляет собой завершенное научное исследование. По актуальности, новизне и практической значимости диссертация безусловно соответствует требованиям установленным Положением «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. №335, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

На заседании 7 октября 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Марии Александровне Андриановой **ученую степень кандидата биологических наук** по специальности 03.01.09 – математическая биология, биоинформатика.

При проведении тайного голосования из **21** человека, входящих в состав диссертационного совета, в заседании участвовали **14** человек, из них **9**

докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации. Проголосовали за – 14, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель

диссертационного совета Д002.077.04

д.б.н., профессор



М.С. Гельфанд

Ученый секретарь

диссертационного совета Д002.077.04

д.б.н., профессор

A handwritten signature in blue ink, which appears to be 'Г.И. Рожкова', is written over the seal area.

Г.И. Рожкова