

На правах рукописи

Иванов Тимофей Михайлович

**Альтернативный сплайсинг tandemно
дублированных экзонов**

Специальность 1.5.8 —
«математическая биология, биоинформатика»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва — 2022

Работа выполнена в Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования “Сколковский Институт Науки и Технологии” (Сколтех).

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук
Первушин Дмитрий Давидович

Официальные оппоненты: **Мошковский Сергей Александрович**,
доктор биологических наук, профессор РАН,
ФГБУ Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины Феде-
рального медико-биологического агентства,
Заведующий лабораторией протеогеномики

Раменский Василий Евгеньевич,
кандидат физико-математических наук,
ФГБУ науки "Национальный медицинский
исследовательский центр терапии и профи-
лактической медицины" Минздрава России,
Руководитель Лаборатории геномной и меди-
цинской биоинформатики

Ведущая организация: ФГБУ науки Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита состоится _____ 2022 г. в __ часов на заседании диссертаци-
онного совета 24.1.101.01 при ФГБУ науки Институт проблем передачи
информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук по адресу:
127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке библиотеке ФГБУ науки
Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской
академии наук (ИППИ РАН), а также на сайте ИППИ РАН.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью учре-
ждения, просьба направлять по адресу: 127051, г. Москва, Большой
Каретный переулок, д. 19, стр. 1, ученому секретарю диссертационного
совета 24.1.101.01.

Автореферат разослан _____ 2022 года.
Телефон для справок: +7 (495) 650-42-25.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.101.01,
д-р биол. наук

Казенников О. В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы.

Основной движущей силой молекулярной эволюции являются мутационные процессы, вносящие передаваемые из поколения в поколение изменения в генетический материал. Наиболее частым и наиболее хорошо изученным типом мутаций являются однонуклеотидные полиморфизмы, т.е. мутации, затрагивающие отдельные нуклеотиды, однако не менее важны и другие виды изменений в последовательности ДНК, такие как, например, дубликации. Как следует из названия, при дубликации определенный участок ДНК оказывается удвоенным. Дубликации возникают благодаря нескольким молекулярным механизмам: негомологичной рекомбинации, ошибкам при репликации ДНК, связанным с диссоциацией и реассоциацией ДНК полимеразы в неправильном положении на ДНК, и ретротранспозиции чужеродного генетического материала в ДНК хозяина. Эти механизмы ответственны также и за другие типы геномных изменений, включая инсерции, делеции, инверсии и транслокации.

Дубликации могут различаться по размеру и охватывать разные масштабы от сотен нуклеотидов до целых геномов. Например, дубликация, затрагивающая всю хромосому (анеуплоидия), возникает из-за нерасхождения этой хромосомы, что приводит к аномальному числу хромосом. Дубликации меньшего масштаба — это так называемые сегментные дубликации, которые представлены длинными последовательностями ДНК (обычно более 1 т.п.н. в длину), которые имеют высокий уровень идентичности последовательностей (более 90%) и представлены в геноме в нескольких копиях. Сегментные дубликации могут быть тандемными, т. е. непосредственно примыкающими друг к другу, или разнесенными в пространстве.

У эукариот тандемные дубликации могут затрагивать целые гены, как белоккодирующие, так и некодирующие, или только части генов. В последнем случае дубликация приводит к удвоению только части последовательности гена, что влияет на экзон-интронную структуру. Процесс, при котором один и тот же экзон некоторого гена дублируется два или более раз или экзоны из разных генов эктопически сближаются, называется перемешиванием экзонов. Молекулярные механизмы перемешивания экзонов в целом такие же, как и в других типах дубликаций, включая ретротранспозицию, кроссинговер во время половой рекомбинации родительских геномов и проскальзывание репликации. Однако, в то время как ретротранспозиция может приводить как к тандемным, так и нетандемным дубликациям, негомологичная рекомбинация и ошибки репликации с большой вероятностью должны приводить именно к тандемным дубликациям экзонов, т. е. повторению нуклеотидной последовательности экзона

несколько раз в одном и том же месте генома. Предметом изучения данной диссертационной работы являются тандемные дубликации экзонов.

В настоящее время в литературе появляется все больше сообщений о том, что альтернативные изоформы транскриптов, образующиеся в результате тандемных дубликаций экзонов, широко распространены в геноме человека и имеют важное значение для заболеваний¹. Также из литературы известно, что транскрипты, содержащие тандемно дублицированные экзоны, часто оказываются подвержены особому виду альтернативного сплайсинга пре-мРНК, при котором один и только один из нескольких экзонов в кластере включается в зрелую мРНК². Такие экзоны называются взаимоисключающими (взаимоисключающие экзоны, ВИЭ). С другой стороны, в литературе имеется много примеров ВИЭ, сплайсинг которых регулируется с помощью так называемых конкурирующих структур РНК — групп регуляторных элементов в пре-мРНК, которые конкурируют друг с другом за комплементарное спаривание с одним и тем же общим элементом³. А именно, такие транскрипты содержат несколько последовательностей, называемых селекторными сайтами, каждый из которых комплементарен одному и тому же регуляторному элементу, называемому докерным сайтом. Считается, что одновременно может образоваться только одна из конкурирующих структур РНК между селекторным и докерным сайтами, что открывает только один экзон из кластера для распознавания сплайсосомай, однако детали молекулярного механизма взаимоисключающего сплайсинга пока во многом остаются неясными⁴.

Тот факт, что тандемные дубликации часто приводят к образованию ВИЭ, сплайсинг которых часто регулируется конкурирующими структурами РНК, наводит на вопрос о существовании общего молекулярного механизма, связанного с природой геномных дубликаций, который мог бы объяснить образование конкурирующих структур РНК. Поиску ответа на этот вопрос и посвящена настоящая диссертация.

Степень разработанности темы. Тандемные дубликации, приводящие к взаимоисключающему сплайсингу экзонов, являются важным

¹The clinical importance of tandem exon duplication-derived substitutions [Текст] / L. Martinez Gomez [и др.] // *Nucleic Acids Res.* 2021. Авг. Т. 49, № 14. С. 8232–8246.

²Kondrashov, F. A. Origin of alternative splicing by tandem exon duplication [Текст] / F. A. Kondrashov, E. V. Koonin // *Hum Mol Genet.* 2001. Ноябрь. Т. 10, № 23. С. 2661–2669; Role and convergent evolution of competing RNA secondary structures in mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yue [и др.] // *RNA Biol.* 2017. Окт. Т. 14, № 10. С. 1399–1410; Noncardiac chest pain: is the esophagus really a frequent source? [Текст] / A. J. Limburg [и др.] // *Scand J Gastroenterol.* 1990. Авг. Т. 25, № 8. С. 793–798.

³RNA secondary structure in mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yang [и др.] // *Nat Struct Mol Biol.* 2011. Февр. Т. 18, № 2. С. 159–168; Role of RNA secondary structures in regulating Dscam alternative splicing [Текст] / B. Xu [и др.] // *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019. Т. 1862, № 11/12. С. 194381.

⁴Smith, C. W. Alternative splicing—when two’s a crowd [Текст] / C. W. Smith // *Cell.* 2005. Окт. Т. 123, № 1. С. 1–3.

механизмом расширения разнообразия протеомов, в связи с чем они активно обсуждаются в научной литературе⁵. По современным оценкам геном *D. melanogaster* содержит как минимум 60 генов, обладающих 261 аннотированными ВИЭ, и еще в 744 генах предсказано существование 3583 ВИЭ⁶. Также существует база данных взаимоисключающих экзонов эукариот⁷. В геноме человека с высокой степенью надежности аннотировано 855 ВИЭ, многие из которых играют важную роль в развитии функции сердечной мышцы, а из данных высокопроизводительного секвенирования РНК и других источников предсказано еще 6541 ВИЭ, многие из которых обогащены патогенными мутациями, а их пространственно-временная экспрессия связана с заболеваниями⁸. В большинстве известных случаев, взаимоисключающий сплайсинг экзонов управляется конкурирующими структурами РНК, причем в отдельных генах было показано существование нескольких групп сложно организованных многодоменных структур⁹. Таким образом, в литературе накоплен большой объем сведений о ВИЭ и регуляции их сплайсинга конкурирующими структурами РНК.

Целью данной работы является выявление эволюционных механизмов, объясняющих общее происхождение взаимоисключающих экзонов и конкурирующих структур РНК при тандемных дупликациях.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Исследовать представленность тандемных дупликаций экзонов в генах человека, *D. melanogaster* и *C. elegans*.
2. Исследовать свойства нуклеотидных последовательностей в кластерах взаимоисключающих экзонов человека и *D. melanogaster*, в частности их способность образовывать конкурирующие структуры РНК.
3. Предсказать конкурирующие структуры РНК, регулирующие взаимоисключающий сплайсинг экзонов в гене *Ate1* человека.

Научная новизна:

1. Впервые показано, что тандемные дупликации экзонов широко распространены не только в кодирующих, но также и в нетранслируемых областях генов животных.

⁵Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs [Текст] / Y. Jin [и др.] // Wiley Interdiscip Rev RNA. 2018. Май. Т. 9, № 3. e1468.

⁶Hatje, K. Expansion of the mutually exclusive spliced exome in Drosophila [Текст] / K. Hatje, M. Kollmar // Nat Commun. 2013. Т. 4. С. 2460.

⁷Hatje, K. Kassiopeia: a database and web application for the analysis of mutually exclusive exomes of eukaryotes [Текст] / K. Hatje, M. Kollmar // BMC Genomics. 2014. Февр. Т. 15. С. 115.

⁸The landscape of human mutually exclusive splicing [Текст] / K. Hatje [и др.] // Mol Syst Biol. 2017. Дек. Т. 13, № 12. С. 959.

⁹Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs [Текст] / Y. Jin [и др.] // Wiley Interdiscip Rev RNA. 2018. Май. Т. 9, № 3. e1468.

2. Получено описание неизвестных ранее тандемных дупликаций экзонов в геноме человека с указанием степени консервативности их последовательностей и уровня экспрессии в тканях.
3. Впервые показано, что интроны в кластерах взаимоисключающих экзонов склонны образовывать конкурирующие структуры РНК, состоящие из докерного и множества селекторных сайтов.
4. Впервые выдвинута гипотеза о том, что тандемные дупликации, затрагивающие экзоны и части фланкирующих интронов, неизбежно приводят к образованию конкурирующих структур РНК и, как следствие, к взаимоисключающему типу сплайсинга.
5. Впервые предсказаны конкурирующие структуры РНК, ответственные за взаимоисключающий сплайсинг экзонов 7a и 7b гена *Ate1* человека.

Практическая значимость. Высказанное в данной работе предположение о закономерном возникновении конкурирующих структур РНК в результате тандемных дупликаций приводит к общему знаменателю и обобщает все известные на данный момент случаи регуляции взаимоисключающего сплайсинга такими структурами. С практической точки зрения это обобщение направляет исследования механизмов взаимоисключающего сплайсинга, в том числе в генах, связанных с болезнями человека, на путь изучения цис-регуляторных элементов вторичной структуры РНК. Исследования в этом направлении также имеют смысл и для тандемных дупликаций, не связанных с аннотированными взаимоисключающими экзонами, поскольку, как здесь было показано, в геномах животных имеется большое число неаннотированных случаев дупликаций экзонов, среди которых часто встречаются взаимоисключающие. Результаты работы представлены через геном браузер, что позволяет исследователям легко визуализировать интересующие их участки генома и находить тандемные дупликации экзонов в них. Конкурирующие структуры РНК, управляющие взаимоисключающим сплайсингом экзонов 7a и 7b гена *Ate1*, можно рассматривать как возможные терапевтические мишени в опухолях, в которых соотношение сплайс-изоформ отличается от физиологического. Таким образом, полученные в данной диссертации результаты имеют фундаментальную научную значимость и широкую практическую применимость.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач использовались методы биоинформатики, включающие в себя методы выравнивания нуклеотидных последовательностей, методы предсказания вторичной структуры РНК и оценки ее свободной энергии, методы сравнительной геномики и методы анализа данных высокопроизводительного секвенирования РНК нового поколения. Для выявления тандемных дупликаций использовались специализированные методы выравнивания нуклеотидных последовательностей с учетом экзон-интронной

структуры. Для предсказания вторичной структуры РНК использовались методы, моделирующие термодинамику взаимодействий РНК-РНК с учетом открытия сайта связывания, и методы, использующие профили доступности с приближительной энергетической моделью. Для оценки уровней экспрессии в тканях использовались данные высокопроизводительного секвенирования РНК из консорциумов Экспрессия Генотипа Ткани (Genotype-Tissue Expression, GTEx)¹⁰ и Атласа Ракового Генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA)¹¹ с применением стандартных методов обработки и картирования чтений и вычисления покрытия. Для визуализации полученных результатов и представления их в публичном доступе использовались трек-хабы на базе геном браузера UCSC¹².

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Интроны и нетранслируемые области генов человека, *D. melanogaster* и *C. elegans* содержат участки, имеющие высокую степень идентичности с аннотированными экзонами и, предположительно, представляющие из себя неаннотированные тандемные дубликации экзонов. Функциональность этих участков подтверждается эволюционной консервативностью и данными по экспрессии в больших панелях транскриптомных экспериментов.
2. Интроны в кластерах взаимоисключающих экзонов человека и *D. melanogaster* обладают повышенным процентом идентичности внутри кластера, который коррелирует с процентом идентичности фланкирующих экзонов, а также повышенной склонностью к образованию комплементарных спариваний, совместимых с моделью докерных и селекторных сайтов, по сравнению с интронами в группах экзонов, подверженных другим типам сплайсинга.
3. Свойства интронов в кластерах взаимоисключающих экзонов указывают на общее происхождение конкурирующих структур РНК и взаимоисключающего сплайсинга через тандемные дубликации, затрагивающие экзоны и части структуры РНК в интронах.
4. Интроны в кластере экзонов 7a и 7b гена *Ate1* человека содержат конкурирующие структуры РНК, предположительно определяющие взаимоисключающий характер сплайсинга этих экзонов и образовавшиеся в результате тандемной дубликации.

Достоверность результатов о роли тандемных дубликаций в образовании конкурирующих структур РНК подтверждается тем, что они, с одной стороны, хорошо согласуются со всеми известными из литературы

¹⁰Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals [Текст] / M. Melé [и др.] // Science. 2015. Май. Т. 348, № 6235. С. 660–665.

¹¹The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project [Текст] / J. N. Weinstein [и др.] // Nat Genet. 2013. Окт. Т. 45, № 10. С. 1113–1120.

¹²The human genome browser at UCSC [Текст] / W. J. Kent [и др.] // Genome Res. 2002. Июнь. Т. 12, № 6. С. 996–1006.

примерами регуляции взаимоисключающего сплайсинга, и, с другой стороны, дополняют и обобщают их. Предсказанная роль конкурирующих структур РНК в регуляции взаимоисключающего сплайсинга экзонов 7a и 7b гена *Ate1* подтверждается экспериментами с антисенс-олигонуклеотидами и мутагенезом, не вошедшими в данную диссертацию [1]. Предсказания существования неаннотированных случаев дубликаций экзонов подтверждаются данными высокпроизводительного секвенирования, в том числе с помощью покрытия и сплит-чтений. Таким образом, результаты находятся в соответствии с публичными транскриптомными данными и с результатами, полученными другими авторами.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на 26-м ежегодном собрании Общества РНК в 2021 году (RNA Society Annual meeting, RNA 2021 — онлайн), на Московской международной конференции по вычислительной молекулярной биологии в 2019 и 2021 годах (Moscow Conference on Computational Molecular Biology, MCCMB 2019 и MCCMB 2021 — Москва, Россия), а также на конференции “Информационные технологии и системы” в 2018 году (ИТиС 2018 — Казань, Россия). По материалам диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых научных журналах.

Личный вклад. Автор принимал активное участие в разработке плана исследования, получении доступа к данным высокпроизводительного секвенирования РНК и их обработке, выполнении исследования, а также в планировании экспериментальных работ по материалам данной диссертационной работы. Представленные результаты получены автором лично.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 7 печатных изданиях, 3 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК, 3 — в периодических научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, 4 — в тезисах докладов.

Диссертационная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-34-90174 “Эволюция взаимно исключающих экзонов и регуляция альтернативного сплайсинга вторичной структурой РНК”.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и 1 приложения. Полный объем диссертации составляет 104 страницы, включая 39 рисунков и 4 таблицы. Список литературы содержит 157 наименований.

Содержание работы

Во **введении** излагаются основные факты о тандемных дубликациях, взаимоисключающих экзонах и роли конкурирующих структур РНК в их сплайсинге, а также обосновывается актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы. Затем формулируется цель работы, ставятся задачи, решение которых необходимо для

достижения поставленной цели, и излагаются научная новизна и практическая значимость работы. Далее во введении объясняется методология исследования, приводятся основные положения, выносимые на защиту, и обосновывается достоверность полученных результатов.

Первая глава содержит обзор литературы, включающий в себя базовые сведения о дупликациях генов и экзонов, механизмах геномных дупликаций, разновидностях альтернативного сплайсинга и, в частности, взаимоисключающим сплайсинге. Далее приводится список работ, посвященных идентификации взаимоисключающих экзонов, в частности на основании изучения длин экзонов и степени идентичности их последовательностей¹³ и филогенетического анализа¹⁴, и отмечается, что не все случаи взаимоисключающего сплайсинга происходят из дупликаций экзонов¹⁵. Все существующие работы по идентификации взаимоисключающих экзонов сведены в табл. 1. Затем подробно обсуждаются механизмы регуляции взаимоисключающего сплайсинга, не связанные со структурой РНК, а именно стерическая интерференция сайтов сплайсинга, сплайсосо-сомная несовместимость и деградация продуктов невзаимоисключающего сплайсинга по механизму нонсенс-опосредованного распада (см. наиболее полный современный обзор в¹⁶).

Далее описывается взаимоисключающий сплайсинг в кластерах экзонов 4, 6 и 9 гена *Dscam1* у *D. melanogaster*, опосредованный конкурирующими структурами РНК, как наиболее выдающийся и наиболее изученный пример такого типа сплайсинга в генах животных¹⁷, а также вводятся определения докерного и селекторного сайтов. Затем приводятся примеры конкурирующих структур РНК в кластерах взаимоисключающих экзонов других генов, таких как *Mhc*¹⁸ и *MRP1*¹⁹ у *D. melanogaster* и *CD55* у человека²⁰. Далее приводится пример конкурирующих структур РНК в

¹³Predicting mutually exclusive spliced exons based on exon length, splice site and reading frame conservation, and exon sequence homology [Текст] / Н. Pillmann [и др.] // BMC Bioinformatics. 2011. Июнь. Т. 12. С. 270.

¹⁴Role and convergent evolution of competing RNA secondary structures in mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yue [и др.] // RNA Biol. 2017. Окт. Т. 14, № 10. С. 1399—1410.

¹⁵Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs [Текст] / Y. Jin [и др.] // Wiley Interdiscip Rev RNA. 2018. Май. Т. 9, № 3. e1468.

¹⁶Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs [Текст] / Y. Jin [и др.] // Wiley Interdiscip Rev RNA. 2018. Май. Т. 9, № 3. e1468.

¹⁷Graveley, B. R. Mutually exclusive splicing of the insect *Dscam* pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures [Текст] / B. R. Graveley // Cell. 2005. Окт. Т. 123, № 1. С. 65—73.

¹⁸Drosophila muscle myosin heavy chain encoded by a single gene in a cluster of muscle mutations [Текст] / S. I. Bernstein [и др.] // Nature. 1983. Т. 302, № 5907. С. 393—397.

¹⁹Grailles, M. The *Drosophila melanogaster* multidrug-resistance protein 1 (MRP1) homolog has a novel gene structure containing two variable internal exons [Текст] / M. Grailles, P. T. Brey, C. W. Mapr. // Gene. 2003. Март. Т. 307. С. 41—50.

²⁰Hatje, K. Expansion of the mutually exclusive spliced exome in *Drosophila* [Текст] / K. Hatje, M. Kollmar // Nat Commun. 2013. Т. 4. С. 2460.

кластере экзонов 5 гена $14\text{-}3\text{-}\zeta$, претерпевшем сравнительно недавнюю дубликацию у *D. melanogaster*²¹, и описывается существенно более сложная организация конкурирующих вторичных структур РНК в кластере экзонов 4 гена *spp*²², взаимоисключительность экзонов в котором достигается за счет сосуществования двух независимых наборов комплементарных областей, образующих псевдоузел.

В заключение критически обсуждаются механизмы регуляции взаимоисключающего сплайсинга конкурирующими структурами РНК в модели Гревели, согласно которой включение инактивированных вариантов экзонов предотвращается некоторым репрессором сплайсинга²³. Также отмечается, что образование комплементарных спариваний между элементами конкурирующих структур РНК само по себе может объяснить сплайсинг только одного из фланкирующих интронов и обсуждается двусторонняя модель регуляции²⁴.

Вторая глава посвящена исследованию представленности тандемных дубликаций экзонов в генах человека, *D. melanogaster* и *C. elegans*. Изложение начинается с описания методологии поиска гомологичных экзонов, основанной на выравнивании нуклеотидных последовательностей экзонов на окрестности последовательностей содержащих их генов с помощью программы *exonerate*²⁵ (рис. 1). Выравнивания собираются в таблицу, в которой каждая строка соответствует одному выравниванию, в дальнейшем называемому парой запрос-мишень, включая выравнивания экзона на себя, а для визуализации для всех пар запрос-мишень создается трек-хаб для геном браузера UCSC.

Затем вводится показатель коэффициента дубликации (КД), определяемый как отношение суммарного числа нуклеотидов, покрытых мишенями к суммарному числу нуклеотидов, покрытых запросами с заданным или более высоким процентом идентичности нуклеотидных последовательностей. По построению, КД всегда больше 1, поскольку каждый запрос служит своей собственной мишенью со 100% идентичностью последовательности. Изучение распределения значений КД в зависимости от порога на степень идентичности последовательностей (рис. 2) показывает,

²¹RNA secondary structure in mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yang [и др.] // Nat Struct Mol Biol. 2011. Февр. Т. 18, № 2. С. 159–168.

²²Nusbaum, M. J. The content of calcium, magnesium, copper, iron, sodium, and potassium in amniotic fluid from eleven to nineteen weeks' gestation [Текст] / M. J. Nusbaum, A. Zettner // Am J Obstet Gynecol. 1973. Янв. Т. 115, № 2. С. 219–226.

²³Graveley, B. R. Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures [Текст] / B. R. Graveley // Cell. 2005. Окт. Т. 123, № 1. С. 65–73.

²⁴Mutually exclusive alternative splicing of pre-mRNAs [Текст] / Y. Jin [и др.] // Wiley Interdiscip Rev RNA. 2018. Май. Т. 9, № 3. e1468.

²⁵Slater, G. S. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison [Текст] / G. S. Slater, E. Birney // BMC Bioinformatics. 2005. Февр. Т. 6. С. 31.

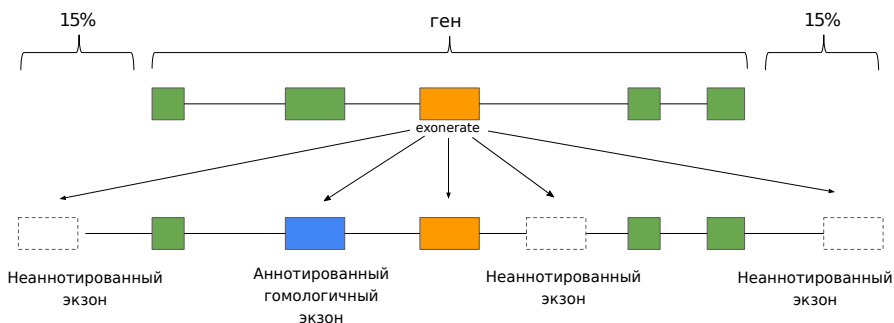


Рис. 1 — Схема поиска тандемных дупликаций экзонов. Нуклеотидная последовательность каждого экзона выравнивается на нуклеотидную последовательность содержащего его гена, расширенную в обе стороны на 15% длины.

что при рассмотрении только экзонов, которые расположены в нетранслируемых областях (НТО), почти 15% экзонных нуклеотидов человека подвергаются дупликациям при пороге отсечения по степени идентичности последовательностей в 80% или более, что указывает на значительно более высокую частоту дупликаций экзонов в НТО. Затем показывается, что доля нуклеотидов, принадлежащих мишеням с порогом отсечения по степени идентичности последовательностей в 80%, в НТО превосходит таковую в кодирующих и межгенных участках, из чего делается вывод о том, что экзоны в НТО больше подвержены тандемным дупликациям, чем другие экзоны.

Для того, чтобы ответить на вопрос о том, не являются ли одни гены более склонными к тандемным дупликациям экзонов, чем другие, значения КД вычисляются для каждого аннотированного гена, а гены с необычно высокими значениями КД, например *SAMK1D*, *CLYBL*, *NBPF20*, *OBSCN* и *NEB* исследуются отдельно. Затем, для того, чтобы обнаружить новые неаннотированные тандемные дупликации экзонов, пары запрос-мишень, которые перекрывают любой аннотированный экзон, исключаются из рассмотрения, а мишени, которые пересекают аннотированные повторы или участки ДНК низкой сложности удаляются, поскольку последние могут содержать экзоны, возникшие через экзонизацию транспозонов. В результате получается список из 4027 неаннотированных интронных мишеней.

Затем в качестве примера генов человека, подверженных тандемным дупликациям экзонов, приводится ген обскурина (*OBSCN*), который охватывает более 150000 п.о. и содержит более 80 экзонов²⁶. Показывается,

²⁶ Fukuzawa, A. Complete human gene structure of obscurin: implications for isoform generation by differential splicing [Текст] / A. Fukuzawa, S. Idowu, M. Gautel // J Muscle Res Cell Motil. 2005. Т. 26, № 6–8. С. 427–434.

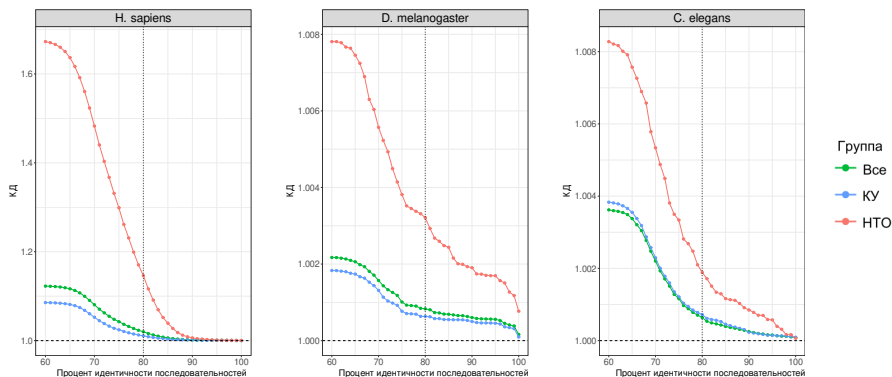


Рис. 2 — Коэффициенты дупликации (КД) в геномах человека, *D. melanogaster* и *C. elegans* как функция процента идентичности нуклеотидных последовательностей запрос-мишень для всех экзонов, экзонов в кодирующих участках (КУ) и экзонов в НТО.

что большинство его экзонов гомологичны друг другу и имеют одинаковую длину, что указывает на их происхождение в результате tandemных дупликаций (рис. 3). Также отмечается, что один из промежуточных интронов обскурина содержит область, обладающую высокой степенью консервативности и поддерживаемую сплит-чтениями на границах, которая гомологична другим экзонам, но не аннотирована как экзон. Кроме этого, в интроне обскурина обнаруживается еще одна область с высоким уровнем консервативности и поддержкой сплит-чтениями, но имеющая меньшую степень идентичности с другими экзонами. Высказывается предположение о том, что найденные области представляют из себя неаннотированные функциональные экзоны. В качестве примеров tandemных дупликаций в нетранслируемых областях приводятся кластеры экзонов в генах *hydra* и *pip* у *D. melanogaster*.

Далее в первой главе обсуждается вопрос об экспрессии неаннотированных tandemных дупликаций. Для этого каждой из 4027 неаннотированных интронных мишеней сопоставляется расположенная рядом контрольная область такой же длины, и вычисляется среднее покрытие чтениями для каждой мишени и для соответствующей контрольной области с учетом только уникально картируемых чтений, т.к. в противном случае невозможно отличить картирования чтений на последовательности запроса и мишени. Распределение величины $\log FC_i = \log_{10}(1 + TC_i) - \log_{10}(1 + CC_i)$, где TC_i — среднее покрытие мишени в ткани i , а CC_i — среднее покрытие контрольного региона в ткани i , показывает, что в группе мишеней с высокой степенью идентичности нуклеотидной последовательности наблюдается значительное превышение уровня экспрессии

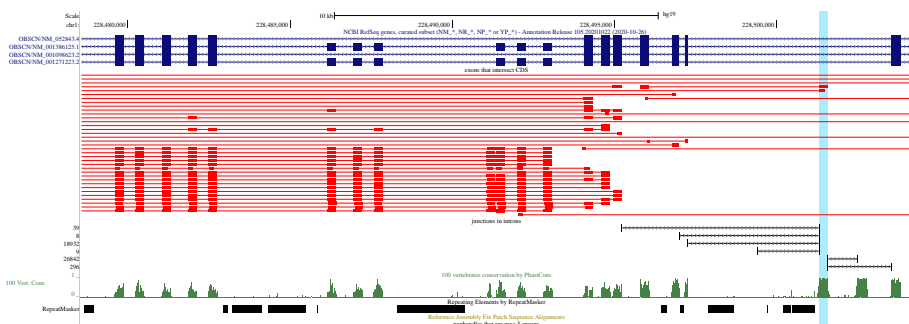


Рис. 3 — Диаграмма тандемных экзонных дупликаций в обскурине *OBSCN*. Темно-синим цветом показаны аннотированные транскрипты (GENCODE и RefSeq). Красным цветом показаны пары запрос-мишень; запросы показаны толстыми прямоугольниками, а мишени — тонкими. Следующий трек показывает поддержку экзонных границ сплит-чтениями. Значения степени консервативности (PhastCons) показаны зеленым цветом.

по сравнению с контролем, которое в некоторых тканях (например в крови, пищеводе, легких, тестикулах, мышце, мозге) остается значимым после коррекции на множественное тестирование. Аналогично с помощью метрики $\log FC_i = \log_{10}(1 + TS_i) - \log_{10}(1 + CS_i)$, где TS_i — суммарное число сплит-чтений, поддерживающих границу мишени в ткани i , а CS_i — суммарное число сплит-чтений, поддерживающих границу запроса в ткани i , приводятся свидетельства экспрессии неаннотированных тандемных дупликаций по сплит-чтениям. Полученные результаты демонстрируют, что по крайней мере некоторые из неаннотированных тандемно дублированных экзонов действительно могут экспрессироваться, причем тканеспецифичным образом.

В заключение приводятся таблицы наиболее экспрессируемых областей в геноме человека, предположительно являющихся тандемными дупликациями экзонов из нетранслируемых и кодирующих областей с указанием их координат, тканей, в которых они экспрессируются, среднего уровня покрытия чтениями, среднего уровня консервативности и числа поддерживающих сплит-чтений.

Третья глава посвящена изучению того, каким именно образом тандемные дупликации могут приводить к образованию ВИЭ и какую роль в их образовании могут играть конкурирующие структуры РНК. Эта глава является центральной частью диссертационной работы.

Изложение начинается с описания методологии, в частности определения “левого”, “правого” и внутренних интронов кластера ВИЭ (рис. 4), графа сплайсинга и множества аннотированных кластеров ВИЭ. Также описываются меры консервативности и гомологии интронов, процедура

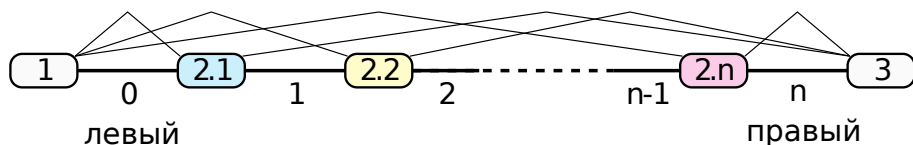


Рис. 4 — Экзоны 1 и 3 конститутивны; экзоны 2.1, 2.2, ..., 2.n являются взаимоисключающими. Интроны пронумерованы от 0 до n . Концевые фланкирующие интроны (0 и n) называются “левым” и “правым”, соответственно.

перемешивания последовательностей с сохранением динуклеотидного состава и вычисление минимальной свободной энергии гибридизации двух РНК двумя способами: с учетом энергии, необходимой для открытия сайта связывания, и по профилям доступности с приближительной энергетической моделью. Вводится показатель $\Delta\Delta G$, определяющий меру слонности двух последовательностей образовывать комплементарные спаривания по сравнению с контрольной парой последовательностей, полученных либо перемешиванием с сохранением частот динуклеотидов, либо случайным выбором последовательностей той же длины.

Далее показывается, что в кластерах ВИЭ *D. melanogaster* и человека фланкирующие интроны обладают повышенной эволюционной консервативностью по сравнению с интронами других классов, что указывает на то, что они могут содержать функциональные регуляторные элементы, которые обеспечивают взаимоисключающий сплайсинг. Затем вычисляется нормализованная мера σ сходства нуклеотидных последовательностей соседних интронов в кластерах ВИЭ и показывается, что соседние интроны в кластерах ВИЭ в среднем обладают значимо большим, хотя и не значительным по абсолютной величине уровнем гомологии, чем контрольные пары последовательностей, а следовательно могут содержать больше гомологичных регуляторных элементов, таких как селекторные последовательности, чем другие интроны. Отмечается, что небольшое абсолютное значение процента идентичности не является неожиданным, так как в известных случаях оно составляет порядка 1-2% для консервативной структуры из 14 нуклеотидов в 600-нуклеотидном интроне²⁷.

Затем показывается, что степень идентичности двух соседних интронов в кластерах ВИЭ положительно коррелирует со степенью идентичности фланкируемых ими экзонов ($r = 0.31$, рис. 5), причем у *D. melanogaster* эта корреляция остается значимой ($r = 0.18$, $n = 139$, t-критерий, P-значение = 0.017) даже после удаления кластера ВИЭ гена *Dscam1*. Из этого наблюдения делается вывод о том, что тандемные дубликации,

²⁷Modulation of alternative splicing by long-range RNA structures in *Drosophila* [Текст] / V. A. Raker [и др.] // *Nucleic Acids Res.* 2009. Авр. Т. 37, № 14. С. 4533–4544.

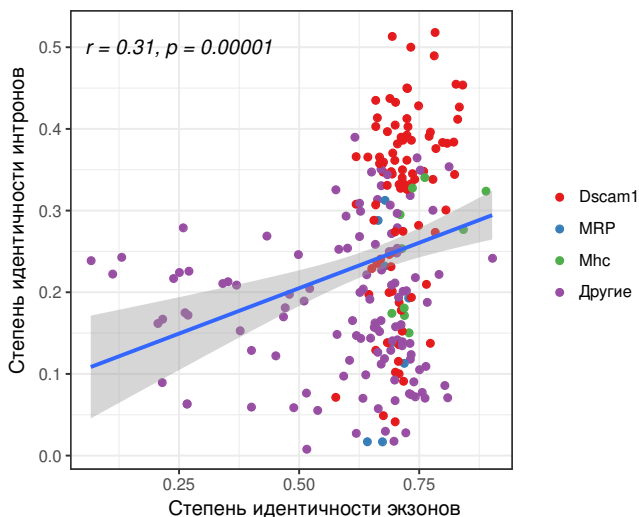


Рис. 5 — Степень идентичности соседних интронов, i и $i + 1$, (ось ординат) по сравнению со степенью идентичности соседних экзонов, i и $i + 1$, (ось абсцисс) у *D. melanogaster*.

в результате которых возникли ВИЭ, могут затрагивать не только экзон, но и часть соседнего интрона.

Далее в третьей главе изучаются комплементарные спаривания в интронах кластеров ВИЭ. Для этого сначала рассматриваются распределения $\Delta\Delta G$ для спаривания левого и правого со внутренними интронами в кластерах экзонов 4, 6 и 9 гена *Dscam1* у *D. melanogaster*, для которых существование конкурирующих структур РНК было показано ранее, и показывается тенденция к формированию структуры РНК во всех трех кластерах (рис. 6). Отмечается, что кластер экзона 4 (12 экзонов) и кластер экзона 9 (33 экзона) содержат докерный сайт в правом интроне, что полностью соответствует литературным сведениям²⁸, а кластер экзона 6 (48 экзонов) имеет склонность к образованию комплементарных спариваний за счет докерных сайтов как в левом, так и в правом интроне, о чем не было известно ранее. Это наблюдение согласуется с моделью двунаправленного контроля, которая была предложена для кластеров экзонов 4 и экзонов 9 *Dscam*, хотя и у других видов²⁹.

Затем изучается вопрос о том, склонны ли левый и правый интроны образовывать комплементарные спаривания с внутренними интронами

²⁸RNA secondary structure in mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yang [и др.] // Nat Struct Mol Biol. 2011. Февр. Т. 18, № 2. С. 159–168.

²⁹Long-range RNA pairings contribute to mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yue [и др.] // RNA. 2016. Янв. Т. 22, № 1. С. 96–110.

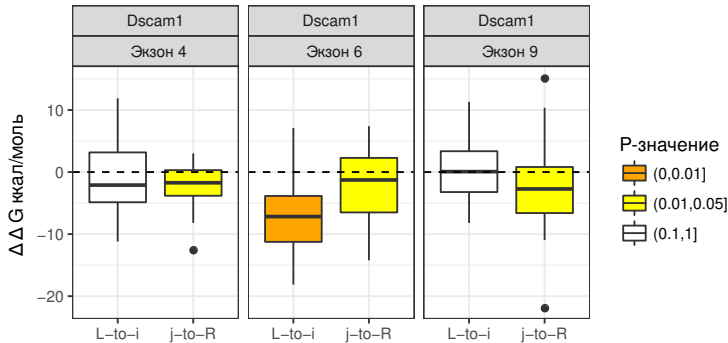


Рис. 6 — Изменение минимальной свободной энергии ($\Delta\Delta G$, ккал/моль) по сравнению с перемешанными последовательностями для гибридизации левого (L-to-i) или правого (j-to-R) интронов со внутренними интронами для трех кластеров ВИЭ гена *Dscam1* у *D. melanogaster*.

в других кластерах ВИЭ (рис. 7). Для ответа на этот вопрос используется программа **RNAplex**, которая не учитывает внутримолекулярную структуру, но может быть эффективно использована для длинных последовательностей интронов. Показывается, что статистически значимое изменение свободной энергии гибридизации с внутренними интронами наблюдается для левого и правого интронов, но не для гибридизации внутренних интронов друг с другом. Таким образом, для левых и правых интронов в аннотированных кластерах ВИЭ наблюдается тенденция образовывать комплементарные спаривания с внутренними интронами, а для спаривания внутренних интронов друг с другом такой тенденции не наблюдается. Это говорит о том, что механизм взаимоисключающего выбора экзонов, основанный на спаривании докерного и селекторных сайтов, который известен для кластеров ВИЭ гена *Dscam1* у *D. melanogaster*, может быть также присущ и многим другим кластерам ВИЭ.

На основании сделанных наблюдений высказывается предположение о том, что тандемные дубликации, затрагивающие экзоны и части фланкирующих интронов, неизбежно приводят к образованию конкурирующих структур РНК и, как следствие, ко взаимоисключающему типу сплайсинга.

А именно, рассматривается дубликация, затрагивающая область генома, содержащую экзон (экзон 2) и часть левого фланкирующего интрона (рис. 8). Дополнительно предполагается, что интрон, находящийся между экзонами 1 и 2, содержит пару комплементарных последовательностей, a и a' , которые способны образовывать шпильчатую структуру, и что только одна из двух комплементарных частей, a' , подверглась дубликации. В результате такой дубликации две копии экзона 2 располагаются тандемно, а a' и его копия a'' комплементарны a . Это создает пару конкурирующих

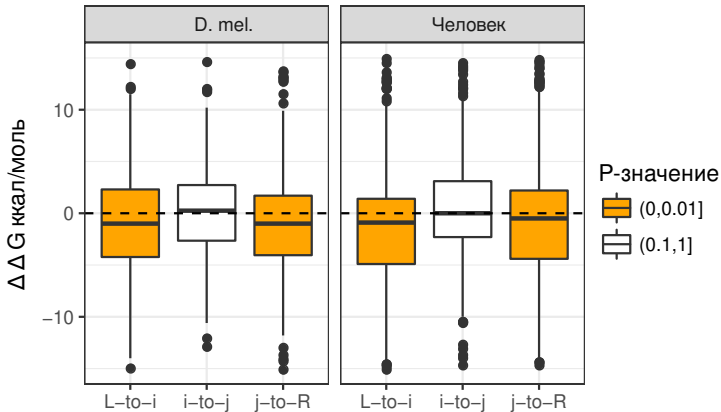


Рис. 7 — Изменение минимальной свободной энергии ($\Delta\Delta G$, ккал/моль) по сравнению с перемешанными последовательностями для гибридизации левого и внутренних интронов (L-to-i), гибридизации правого и внутренних интронов (j-to-R) и гибридизации между внутренними интронами (i-to-j) у *D. melanogaster* и человека. Цветовые коды показывают значимые отличия от нуля по знаковому критерию Уилкоксона.

структур РНК, в которых a спаривается либо с a' , либо с a'' ; в первом случае включается экзон 2.1, а во втором случае он выпетливается и пропускается. Этот сценарий дает правдоподобное объяснение тому, как последовательности докерных и селекторных сайтов могут самопроизвольно возникать в результате тандемных дупликаций. Аналогичным образом дупликации могут создавать конкурирующие структуры РНК с правым докерным сайтом (рис. 9).

Затем показывается, что небольшая модификация сценария, показанного на рис. 8, может объяснить эволюционный механизм, который способен генерировать также и двунаправленные конкурирующие структуры РНК. Для этого рассматривается геномная дупликация, затрагивающая экзон, а также два его фланкирующих интрона, которые содержат две пары комплементарных последовательностей, a и a' , а также b' и b (рис. 10). В результате такой дупликации две копии экзона 2 снова будут расположены тандемно, а также образуются две конкурирующие структуры РНК, в которых $a - a'$ конкурирует с $a - a''$, а $b' - b$ конкурирует с $b'' - b$. Примечательно, что они будут расположены так, что b'' будет располагаться в направлении 5'-конца гена относительно a'' , что совпадает с наблюдаемым расположением в гене *srp*. Несмотря на то, что каждая пара конкурирующих структур может образовываться независимо от другой пары, не все четыре комбинации равновероятны из-за псевдоузла. Если a спаривается с a' , а b'' спаривается с b , то экзон 2.2 выпетливается и пропускается.

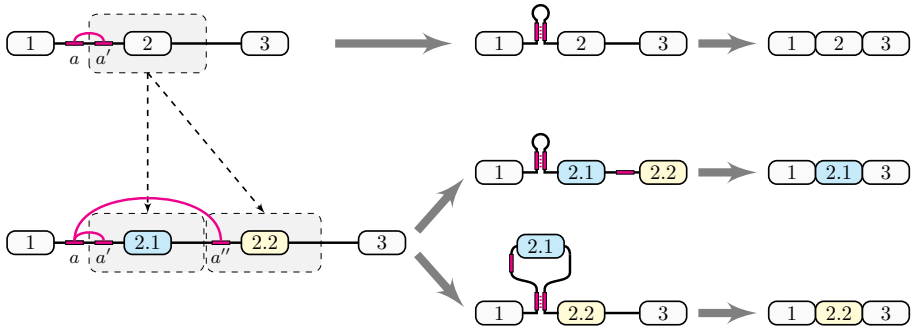


Рис. 8 — Механизм образования конкурирующих структур РНК с левым докерным сайтом посредством дубликации. Если дубликация затрагивает экзон и одно плечо шпильчатой структуры, расположенной в левом фланкирующем интроне, то образуется пара селекторных сайтов, которые могут конкурировать за один докерный сайт.

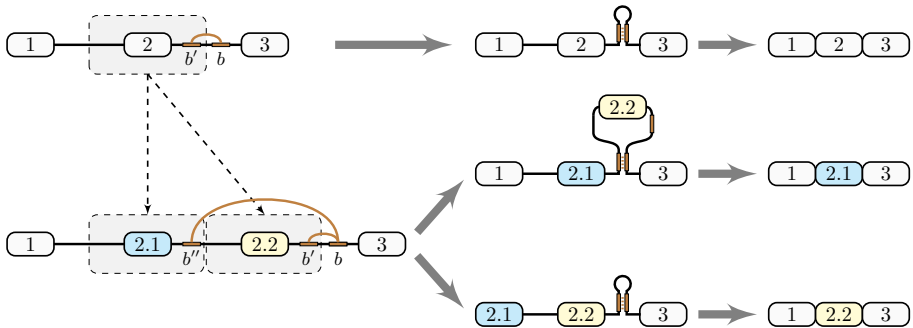


Рис. 9 — Механизм образования конкурирующих структур РНК с правым докерным сайтом посредством дубликации (аналогично рис. 9).

Наоборот, если a спаривается с a'' , а b' спаривается с b , то экзон 2.1 выпетливается и пропускается. По прежнему возможно, что a соединяется с a' , а b' соединяется с b так, что ни один экзон не выпетливается, и это приводит к одновременному включению обоих экзонов. В отличие от однонаправленной модели (рис. 8), двунаправленная модель механически объясняет подавление обоих вариантов ВИЭ.

Далее в третьей главе обсуждается вопрос о регулируемости ВИЭ конкурирующими структурами РНК, суть которого сводится к следующему. Расположение докерного и селекторных сайтов в модели регуляции взаимоисключающего сплайсинга допускает два варианта. В первом варианте докерный сайт расположен перед кластером ВИЭ в левом интроне, как это происходит в кластере экзонов 6 гена *Dscam1*. В другом варианте докерный сайт располагается после всех ВИЭ в правом интроне, как

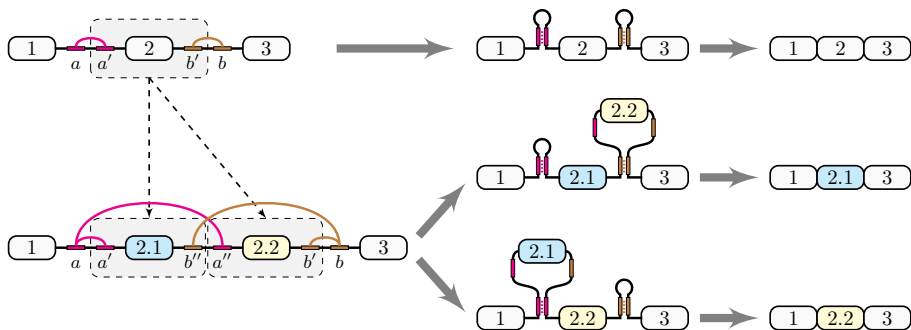


Рис. 10 — Если тандемная дупликация затрагивает экзон и части двух его фланкирующих интронов, каждая из которых содержит шпильчатую структуру, она может создать две пары конкурирующих комплементарных последовательностей, каждая из которых будет выпетливать один из экзонов 2.1 и 2.2. Расположение комплементарных частей в точности соответствует двунаправленной модели в гене *srp*.

это происходит в генах *14-3-3ζ*, *Mhc*, *MRP1* и других кластерах ВИЭ³⁰. Двунаправленная модель допускает оба этих варианта одновременно. При этом некоторые гены предпочитают левые докерные сайты, в то время как другие используют правые для регуляции сплайсинга ВИЭ.

В заключение высказывается предположение о том, что фундаментальное различие между левыми и правыми докерными сайтами может заключаться в регулируемости их спариваний с селекторными последовательностями. Поскольку структура РНК формируется ко-транскрипционно³¹, то спаривание $a' - a$ получает кинетическое преимущество по сравнению со спариванием $a - a''$, если докерный сайт расположен в левом интроне, в противоположность тому, что b'' и b' транскрибируются последовательно и получают равные шансы на спаривание с b , который появляется последним, если докер-сайт расположен в правом интроне. Данное наблюдение хорошо согласуется с тем фактом, что в изученных кластерах ВИЭ преобладают конфигурации с правым докерным сайтом (результаты приведены в табл. 2).

В **четвертой главе** полученные результаты иллюстрируются на примере кластера ВИЭ в гене *Ate1* человека и предсказывается существование в нем конкурирующих структур РНК.

³⁰Role and convergent evolution of competing RNA secondary structures in mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yue [и др.] // RNA Biol. 2017. Окт. Т. 14, № 10. С. 1399–1410; RNA secondary structure in mutually exclusive splicing [Текст] / Y. Yang [и др.] // Nat Struct Mol Biol. 2011. Февр. Т. 18, № 2. С. 159–168.

³¹Coupling of RNA Polymerase II Transcription Elongation with Pre-mRNA Splicing [Текст] / T. Saldi [и др.] // J Mol Biol. 2016. Июнь. Т. 428, № 12. С. 2623–2635.

Изложение начинается с описания функции продукта гена *Ate1*, который кодирует аргинилтрансферазу, необходимую для функционирования большинства эукариотических систем. Описываются альтернативные изоформы транскриптов *Ate1*, отличающиеся взаимоисключающим выбором двух соседних гомологичных экзонов длиной 129 п.н. (экзоны 7а и 7b) и альтернативным выбором начального экзона. Обсуждаются разная локализация и канцерогенный потенциал этих изоформ и тот факт, что соотношение изоформ *Ate1*, содержащих экзоны 7а и 7b, существенно меняется во время мейоза у самцов, что указывает на роль взаимоисключающего сплайсинга в переходе от митотического к мейотическому циклу зародышевых клеток.

Затем описывается методология, включающая в себя анализ данных секвенирования полиаденилированной фракции РНК из консорциумов Экспрессия Генотипа Ткани (Genotype-Tissue Expression, GTEx) и Атласа Ракового Генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA)³², вычисление степени включения индивидуальных экзонов и логарифмического изменения соотношения изоформ, а также анализ множественных выравниваний последовательностей геномов позвоночных с геномом человека.

Далее изучается распределение степени включения экзонов по данным TCGA и GTEx и делается вывод о том, что эти экзоны действительно сплайсируются взаимоисключающим образом в здоровых тканях и опухолях, причем изоформа, содержащая экзон 7а, обладает наиболее заметным отклонением в образцах аденокарциномы простаты по сравнению с нормальными тканями, а также в других эпителиальных опухолях, включая аденокарциному желудка, прямой кишки, толстой кишки и плоскоклеточный рак легкого (рис. 11). Таким образом, изучение молекулярного механизма взаимоисключающего сплайсинга экзонов 7а и 7b гена *Ate1* человека представляется интересным для понимания как тканеспецифического, так и опухолеспецифического сплайсинга.

Затем при помощи сравнительного анализа последовательностей гена *Ate1* у позвоночных и каталога комплементарных областей в геноме человека³³ в интронах гена *Ate1* обнаруживаются консервативные области R1–R5, причем R1 и R4, расположенные непосредственно перед экзонами 7а и 7b, обе комплементарны R3, а R2 комплементарна другой высококонсервативной области R5, расположенной в интроне между экзонами 7b и 8 на расстоянии приблизительно 30 т.п.о. в направлении 3'-конца (рис. 12). Таким образом, R1 и R4 могут конкурировать друг с другом

³²Human genomics. The human transcriptome across tissues and individuals [Текст] / M. Melé [и др.] // Science. 2015. Май. Т. 348, № 6235. С. 660–665; The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project [Текст] / J. N. Weinstein [и др.] // Nat Genet. 2013. Окт. Т. 45, № 10. С. 1113–1120.

³³Conserved long-range base pairings are associated with pre-mRNA processing of human genes [Текст] / S. Kalmykova [и др.] // Nat Commun. 2021. Апр. Т. 12, № 1. С. 2300.

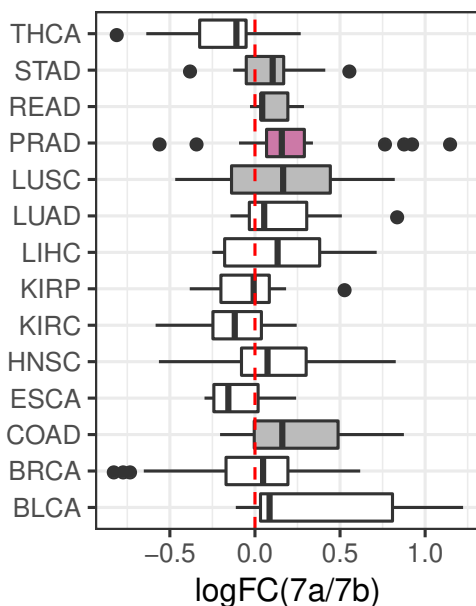


Рис. 11 — Относительная экспрессия изоформ экзона 7a/7b (разница $\log_{10} \frac{7a}{7b}$ между опухолью и нормальной тканью из одного и того же донора) по данным консорциума TCGA. Относительная экспрессия значительно повышена в раке желудка (STAD), раке прямой кишки (READ), колоректальном раке (COAD), аденокарциноме предстательной железы (PRAD) и в плоскоклеточном раке легкого (LUSC). Критерий Уилкоксона FWER < 0.05 (фиолетовый), $P < 0.05$ (серый).

за гибридизацию с R3, а вместе со спариванием R2 с R5 они образуют псевдоузел.

Далее обсуждается вопрос о том, могли ли области R1–R5 образоваться в результате тандемной дупликации, охватывающей предковый экзон и часть последовательности интрона. Однако выясняется, что ген-предшественник, в котором между экзонами 6 и 8 располагался бы только один вариант экзона 7, в настоящее время сохранился только у *C. intestinalis*, а степень идентичности его последовательности недостаточна для того, чтобы обнаружить комплементарные участки, гомологичные R1, R3 и R4. Таким образом, в случае экзонов 7a и 7b у *Ate1* дупликация, вероятно, произошла после радиации хордовых, поскольку гомолог экзона 7b отсутствует у беспозвоночных, но отследить происхождение R1, R3 и R4 не представляется возможным, поскольку конкурирующие вторичные

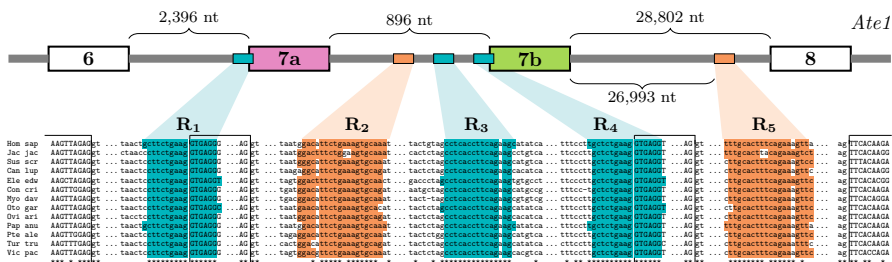


Рис. 12 — Выравнивание кластера ВИЭ в гене *Ate1*. Консервативные интронные элементы обозначены R1–R5.

структуры РНК обычно не сохраняются на больших эволюционных расстояниях³⁴. Далее изучается, как изменялись длины интронов в кластере ВИЭ гена *Ate1* в ходе эволюции, и показывается, что длина фланкирующего интрона в сторону 3' конца гена от экзона 7b уменьшается по мере увеличения эволюционного расстояния от человека, что позволяет предположить, что дополнительное комплементарное спаривание между элементами R2 и R5 могло образоваться после дупликации, чтобы противодействовать экспансии интрона в сторону 3' конца гена от экзона 7b.

В **заключении** приведены основные результаты работы, которые заключаются в следующем:

1. Показано, что тандемные дупликации экзонов широко распространены не только в кодирующих, но и в нетранслируемых областях генов животных, а также получено описание неизвестных ранее тандемных дупликаций экзонов в геноме человека с указанием степени их консервативности и уровня экспрессии в тканях.
2. Показано, что интроны в кластерах взаимоисключающих экзонов склонны образовывать конкурирующие структуры РНК, состоящие из докерного и множества селекторных сайтов.
3. Высказано предположение о том, что тандемные дупликации, затрагивающие экзоны и части фланкирующих интронов, неизбежно приводят к образованию конкурирующих структур РНК и, как следствие, к взаимоисключающему типу сплайсинга. А именно, если в интроне, прилегающем к предковому экзону содержалась шпичечная структура, а дупликация затронула только одну из двух ее комплементарных частей, то после дупликации образуется пара селекторных сайтов, конкурирующих за один и тот же докерный сайт. Данное предположение согласуется со всеми

³⁴The landscape of human mutually exclusive splicing [Текст] / К. Hatje [и др.] // Mol Syst Biol. 2017. Дек. Т. 13, № 12. С. 959.

известными из литературы примерами регуляции взаимоисключающего сплайсинга конкурирующими структурами РНК, а также дополняет и обобщает их.

4. Предсказаны конкурирующие структуры РНК, отвечающие за взаимоисключающий сплайсинг экзонов 7а и 7b гена *Ate1* человека.

Публикации автора по теме диссертации

1. Multiple competing RNA structures dynamically control alternative splicing in the human ATE1 gene [Текст] / M. Kalinina [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2021. — Янв. — Т. 49, № 1. — С. 479—490.
2. *Ivanov, T. M.* Tandem Exon Duplications Expanding the Alternative Splicing Repertoire [Текст] / T. M. Ivanov, D. D. Pervouchine // *Acta Naturae.* — 2022. — Т. 14, № 1. — С. 73—81.
3. *Ivanov, T. M.* An Evolutionary Mechanism for the Generation of Competing RNA Structures Associated with Mutually Exclusive Exons [Текст] / T. M. Ivanov, D. D. Pervouchine // *Genes (Basel).* — 2018. — Июль. — Т. 9, № 7.
4. *Иванов, Т. М.* Эволюция взаимоисключающих экзонов [Текст] / Т. М. Иванов // Информационные технологии и системы (ИТИС). — 2018.
5. *Иванов, Т. М.* Эволюция взаимоисключающих экзонов [Текст] / Т. М. Иванов // Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии (МССМВ). — 2019.
6. *Иванов, Т. М.* Тандемные дубликации экзонов расширяют репертуар альтернативного сплайсинга [Текст] / Т. М. Иванов // Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии (МССМВ). — 2021.
7. *Ivanov, T. M.* Tandem exon duplications expanding splicing repertoire [Текст] / T. M. Ivanov // 26-th Annual meeting of RNA Society (RNA). — 2021.

Иванов Тимофей Михайлович

Альтернативный сплайсинг тандемно дублированных экзонов

Автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук

Подписано в печать _____.____._____. Заказ № _____

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Типография _____