

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Иванова Тимофея Михайловича** «Альтернативный сплайсинг тандемно дублированных экзонов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика.

**Основные научные результаты и их актуальность.** Работа соискателя посвящена проблеме, к которой еще недавно было достаточно сложно подступиться. Речь об исследовании механизмов образования и регуляции альтернативных изоформ матричных РНК, кодируемых одним и тем же геном. Известно, что у высших эукариот набор финальных продуктов такого рода зависит от работы основополагающих процессов обработки этих РНК, среди которых нужно упомянуть, в первую очередь, альтернативный сплайсинг, а также различные посттранскрипционные модификации, например, редактирование РНК аденозиндезаминазами и прочее. Транскрибируемые пре-мРНК в ядре подлежат процессингу, исход которого зависит от таких параметров, как стехиометрические отношения РНК-связывающих белков, присутствующих по близости, агрегатное состояние сплайсеосом и наличие конкурирующих РНК. Образовавшийся в итоге набор зрелых РНК, готовый к транспорту из ядра и трансляции, определяет молекулярный фенотип в клетке и, в итоге, может существенно влиять на нормальные и патологические процессы в масштабе целых организмов. Таким образом, исследованная в работе тема является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

**Общая характеристика работы.** Диссертация изложена на 103 страницах и состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы и двух приложений. В ней ее автор сосредоточился на исследовании явления, возникающего на геномном уровне, но непосредственно влияющего на итоги процессинга матричных РНК. Речь об образовании в геноме тандемно дублированных экзонов, которые затем, как оказалось, конкурируют друг с другом, чтобы сохраниться в итоговом зрелом транскрипте. Обнаружены взаимоисключающие дублированные экзоны, которые в итоге оказываются транслированы только в одном варианте. К результатам диссертации относится обнаружение подобных экзонов в геномах человека, плодовой мушки и нематоды *Caenorhabditis elegans* и оценка экспрессии соответствующих им альтернативных

матричных РНК в некоторых доступных данных по транскриптомике. Предсказаны термодинамические характеристики дублированных экзонов, значимые для их конкурентного сплайсинга. Одно из важных для биологии достижений диссертации – биоинформатическая поддержка проекта по экспериментальному установлению механизма конкуренции экзонов при сплайсинге в результате чего они становятся взаимоисключающими, на примере экзонов 7a и 7b гена *Ate1* человека. Все эти работы выполнены на высоком научно-техническом уровне. Использованный инструментарий, включая оригинальное программное обеспечение, также отвечает современным научным критериям. Ценность результатов работы отражена в публикациях хорошего уровня.

Автор диссертации высказывает предположение о том, что взаимоисключающий сплайсинг является следствием того, что при дубликации части гена с высокой вероятностью возникают конкурирующие структуры РНК, приводящие к взаимному исключению экзонов. Данная гипотеза представляется верной с общебиологических позиций и объясняет множество известных из литературы примеров взаимоисключающего сплайсинга. В рассуждении о регулируемости взаимоисключающего сплайсинга РНК-структурами с левым и правым докерными сайтами автор приходит к обоснованному заключению о том, что расположение докерного сайта в правом фланкирующем интроне кластера дает больше возможностей для регуляции.

**Степень обоснованности научных положений.** Выносимые на защиту научные положения основаны на сравнительном анализе геномных последовательностей, предсказании структуры РНК и анализе большого массива транскриптомных данных из открытых источников. Корректность методов не вызывает сомнения и подтверждается публикациями в рецензируемых научных журналах. Достоверность результатов подтверждается статистическим анализом и множеством литературных данных.

**Научная новизна.** Все представленные в диссертации Иванова Т.М. данные получены впервые, опубликованы в научных журналах и представлены на отечественных и международных конференциях. Результаты о представленности тандемных дубликаций в нетранслируемых областях, описание уровней экспрессии ранее неизвестных тандемных дубликаций в тканях человека, гипотеза о возникновении конкурирующих структур РНК в результате тандемных дубликаций и описание конкурирующих структур РНК в гене

Atel1 человека являются принципиально новыми. Результаты диссертации представляют интерес как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения.

**Общие замечания.** Работа построена по традиционному принципу и содержит все принятые в кандидатских диссертациях разделы. При ее подготовке использовано значительное количество современных литературных источников. Результаты работы представлены на международных конференциях и в полной мере отражены в научных публикациях.

Тем не менее, к этой, в целом, очень хорошей работе есть некоторые вопросы и критические замечания.

1. На стр. 56 описываются методы оценки свободной энергии взаимодействия РНК. В частности, упоминаются программы RNAur и RNAplex, но не объясняется зачем нужно использовать две различные программы и почему классические методы предсказания структуры РНК, такие как MFOLD, не применялись. Также на стр 56. говорится, что Значения  $\Delta\Delta G$ , превышающие 30 ккал/моль по абсолютной величине, отбрасывались. Казалось бы такие высокие значения энергии обладают высокой значимостью и получить их по случайным причинам было бы маловероятно. Почему они не рассматривались?
2. На стр. 64 утверждается, что "первый и последний интроны в кластерах ВИЭ обладают высокой склонностью к гибридизации с внутренними интронами". Нет ли в этом наблюдении статистического артефакта, связанного с тем, что первый и последний интроны расположены ближе к нетранслируемым частям генов?
3. На стр. 22 в обзоре литературы автор сообщает, что "Граф сплайсинга — это ориентированный ациклический граф, вершины которого соответствуют позициям или интервалам в нуклеотидной последовательности, а ребра — событиям сплайсинга." В литературе встречаются как минимум три различных определения графа сплайсинга и не понятно почему для изложения в диссертационной работе выбрано именно это. Возможно это связано с исследованием именно ВИЭ?
4. Важный вопрос, который, насколько мне стало понятно, не был в полной мере освещен в работе, касается биомедицинской роли дублированных повторов. Автор наблюдает различные сдвиги в их уровнях, на примере фермента Atel1, в злокачественных опухолях. Однако, наблюдаем ли мы всего лишь симптом разбалансировки сплайсинга, столько характерной для опухолевых фенотипов, или

же данные сдвиги вносят вклад в патогенез? Было бы интересно сформулировать и впоследствии проверить соответствующие гипотезы.

5. В принципе в работе, сделанной на высоком техническом уровне, заметен некоторый отрыв от биологии как таковой. Объекты – гены, мРНК - описываются как строчки кода или какие-то отвлеченные математические объекты. Несколько утрачена связность этих весьма конкретных явлений с конкретными последствиями на уровне клеток и организмов, то есть с биологической составляющей представленного сложного анализа. Повествование ведется для человека, который уже участвует в этом проекте, поэтому многие вещи подразумеваются сами собой. Это усложняет понимание некоторых аспектов работы даже для специалиста.
6. Из предыдущего замечания вытекает следующее – сложный для восприятия, искусственный язык повествования во всех частях диссертации. Современная геномная и постгеномная биология вообще с трудом переводится на другие языки с английского. В диссертации заметно, что автор не везде пытался адаптировать повествование к нормам русского языка. Отмечу, например, формально не противоречащее нормам, но очень тяжело звучащее определение «белоккодирующий» в применении к гену, широко используемое в тексте.

Замечания и вопросы к работе, как можно видеть, несущественны. Они не умаляют ее высокой научной значимости. Считаю диссертацию законченным научным трудом, а ее автора – зрелым исследователем, готовым к самостоятельной работе.

**Заключение.** Диссертационная работа Иванова Тимофея Михайловича на тему “Альтернативный сплайсинг тандемно дублированных экзонов”, выполненная в Сколковском Институте Науки и Технологии и представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой, в которой выявлены важные закономерности между тандемными дубликациями экзонов и их взаимоисключающим сплайсингом.

Диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне, полностью отвечает критериям пунктов 9–14 “Положения о присуждении научных степеней”, утвержденного Постановлением Правительства РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Иванов Тимофей

Михайлович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 — «математическая биология, биоинформатика».

Заведующий лабораторией протеогеномики

Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства,

доктор биологических наук, профессор РАН



Мошковский Сергей Александрович

Личную подпись д.б.н. Мошковского Сергея Александровича заверяю:

ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства,

кандидат биологических наук



Грибова Татьяна Николаевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

Тел.: +7 (499) 246-4409

E-mail: [info@rcpcm.org](mailto:info@rcpcm.org)

Сайт организации: <http://rcpcm.org/>

2 ноября 2022 г.