

**УТВЕРЖДАЮ**

Зам. директора ИОГен РАН



С.А. Брускин

8 ноября 2022 г.

### **ОТЗЫВ**

**ведущей организации на диссертационную работу Иванова Тимофея Михайловича «Альтернативный сплайсинг тандемно дублированных экзонов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 — «математическая биология, биоинформатика»**

**Актуальность темы исследования.** При альтернативном сплайсинге из транскриптов одного гена могут получаться различные матричные РНК и, после трансляции, разные белки. Широкое распространение альтернативного сплайсинга у эукариот приводит к значительному увеличению разнообразия белков. Протеом человека содержит более 100 тысяч различных белков, в то время как число кодирующих их генов примерно 20 тысяч. Достаточно редким, но тем не менее важным типом альтернативного сплайсинга являются взаимоисключающие экзоны --- группа тандемно расположенных экзонов (кластер), из которых один и только один включается в зрелую мРНК. Исследования последних лет показали, что в подавляющем большинстве кластеров взаимоисключающие экзоны гомологичны друг другу и имеют одинаковую длину. В связи с этим было высказано предположение о том, что взаимоисключающие экзоны возникают при тандемных геномных дупликациях. В ряде случаев механизм взаимоисключающего сплайсинга экзонов был исследован экспериментально. Было показано, что в ряде важных случаев за взаимную исключительность экзонов отвечают так называемые конкурирующие РНК-структуры, состоящие из общего докерного сайта и множества комплементарных ему селекторных сайтов. Поскольку докерный сайт один, а

селекторных сайтов много, то может образоваться один и только один РНК-дуплекс, что обеспечивает включение одного и только одного из экзонов. Представленная диссертация посвящена изучению связи между тандемными дупликациями, взаимным исключением экзонов и конкурирующими РНК-структурами. Поставленный вопрос представляет интерес как с фундаментальной точки зрения для понимания общих механизмов альтернативного сплайсинга и его регуляции РНК-структурами, так в контексте взаимоисключающего сплайсинга в болезнетворных генах и его нарушении при патологиях. Таким образом, тема диссертации представляется актуальной и имеющей важное научное и практическое значение.

**Структура работы.** Диссертация изложена на 103 страницах и состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы и вспомогательных разделов. Первая глава содержит обзор литературы, который подразделяется на три раздела, соответствующих трем изучаемым объектам --- тандемным дупликациям, взаимоисключающим экзонам, и конкурирующим РНК-структурам. Первый раздел посвящен описанию дупликаций генов, дупликаций экзонов, и механизмам дупликаций. Вторым разделом описывается альтернативный сплайсинг, взаимоисключающие экзоны, и механизмы их регуляции. Третий раздел посвящен конкурирующим РНК-структурам и содержит множество примеров регуляции взаимного исключения экзонов такими структурами.

Последующие три главы посвящены трем независимым частям работы --- исследованию представленности тандемных дупликаций экзонов, анализу известных кластеров взаимоисключающих экзонов и предсказанию неизвестного ранее механизма регуляции взаимоисключающего сплайсинга в гене *Ate1* человека. Основные результаты диссертации изложены во второй главе. Каждая из глав содержит описание материалов и методов, что, по-видимому, объясняется различием в спектре решаемых задач. В ходе обсуждения результатов автор приходит к предположению о закономерном происхождении конкурирующих структур при тандемных дупликациях и обсуждает несколько потенциальных регуляторных механизмов, представляющих научную новизну. Текст диссертации написан ясно и четко, без лишних отступлений, с использованием принятой научной терминологии.

**Основные научные результаты и их значимость для науки и практики.** Основные результаты диссертации изложены в главах 2–4. Во второй главе,

посвященной исследованию представленности tandemных дупликаций экзонов, автор приходит к выводу о том, что tandemные дупликации распространены не только в кодирующих, но и в нетранслируемых областях. Приводятся примеры tandemных дупликаций и с использованием больших транскриптомных данных показывается, что некоторые из дублицированных экзонов экспрессируются в тканях человека. Во третьей главе анализируются известные кластеры взаимоисключающих экзонов и статистически показывается, что образовавшие их дупликации, вероятно, затрагивали не только сами экзоны, но и соседние интроны, а также приводятся статистические свидетельства наличия в интронах докерных и селекторных сайтов, образующих конкурирующие РНК-структуры. На основании этого автор выдвигает гипотезу о том, что конкурирующие РНК-структур закономерно возникают при tandemных дупликациях и приводят ко взаимному исключению экзонов. Автор обсуждает несколько не известных ранее потенциальных эволюционных механизмов. В последней, четвертой главе автор предсказывает неизвестный ранее механизм регуляции взаимоисключающего сплайсинга в гене *ate1* человека, который теоретически можно использовать для разработки терапевтических мишеней для опухоли предстательной железы.

**Научная новизна.** В своей работе Т.М. Иванов впервые показал, что tandemные дупликации экзонов более распространены в нетранслируемых областях, чем в кодирующих участках генов животных. Впервые приводится описание неизвестных ранее tandemных дупликаций экзонов в геноме человека с указанием уровня экспрессии в тканях. Впервые показано, что интроны в кластерах взаимоисключающих экзонов содержат следы tandemных дупликаций и склонны образовывать конкурирующие структуры РНК, состоящие из множества селекторных и одного докерного сайтов, причем последние расположены в первом и последнем интронах кластеров. Впервые выдвинута гипотеза о том, что tandemные дупликации, затрагивающие экзоны и части фланкирующих интронов, неизбежно приводят к образованию конкурирующих структур РНК и, как следствие, к взаимоисключающему типу сплайсинга. Впервые предсказаны конкурирующие структуры РНК, объясняющие взаимоисключающий сплайсинг экзонов 7a и 7b гена *ate1* человека.

**Обоснованность и достоверность результатов и выводов.** Результаты, полученные в диссертации Иванова Т.М. хорошо согласуются с известными из литературы механизмами регуляции взаимоисключающих экзонов, в частности для

генов *dscam1*, *mpr*, и *spr* *D. melanogaster*, а также дополняют и обобщают их. Результаты о представленности tandemных дупликаций в нетранслируемых областях представляются обоснованными, так как показано, что экзоны в нетранслируемых областях обладают гомологами в содержащих их генах, а сами нетранслируемые области содержат большее число гомологов экзонов, чем кодирующие области. Предсказания существования неаннотированных случаев дупликаций экзонов также являются достоверными, поскольку приведено подтверждение их экспрессии в тканях человека по данным высокопроизводительного секвенирования, в том числе с помощью покрытия и сплит-чтений. Роль конкурирующих РНК-структур, предсказанных в кластере экзонов 7 гена *ate1* человека, в регуляции взаимоисключающего сплайсинга этих экзонов, подтверждается их эволюционной консервативностью, а также экспериментами по мутагенезу в минигенах и блокировке конкурирующих РНК структур с помощью антисенс-олигонуклеотидов, приведенными в опубликованной соискателем научной статье в соавторстве с другими исследователями. Таким образом, теоретические результаты диссертации согласуются с экспериментальными результатами, опубликованными другими научными группами, в том числе с публичными транскриптомными данными. Поэтому результаты диссертации являются обоснованными и достоверными.

**Полнота изложения материалов диссертации в печатных работах.** Основные положения и результаты диссертации изложены автором в трех статьях по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации, и четырех тезисах, представленных на российских и международных конференциях. В опубликованных работах текст диссертации изложен полностью. Автореферат написан в соответствии с требованиями и полностью отражает содержание диссертации и научных публикаций. Положения, выносимые на защиту, также полностью изложены в автореферате.

**Замечания.** Несмотря на общий высокий уровень работы можно указать некоторые замечания: 1) Вторая глава диссертации посвящена анализу представленности tandemных дупликаций в геномах человека, дрозофилы и нематоды, а третья глава диссертации посвящена изучению известных кластеров взаимоисключающих экзонов в геномах человека и дрозофилы. В тексте нигде не объясняется почему в

третьей главе отсутствуют результаты для нематоды. 2) Пункт 3.3.2 диссертации на странице 68 посвящен регулируемости взаимного исключения экзонов конкурирующими структурами РНК. Автор делает предположение о том, что правые докерные сайты обладают большим потенциалом для регуляции, чем левые и поэтому более распространены в природе. Данное предположение представляется верным из общих соображений, однако автор не приводит примеров направленной регуляции взаимосключающего сплайсинга какими-либо факторами. Существуют ли такие примеры? 3) На стр. 47 упоминаются “тандемно повторяющихся гомологичные кластеры взаимоисключающих терминальных экзонов” в гене *rip*, что не соответствует изображению на рис 2.8. Вероятно имелись в виду гомологичные, тандемно повторяющиеся, взаимоисключающие кластеры терминальных экзонов? 4) На рис. 2.4 показано распределение частот значений КД для генов человека, но не объясняется что именно изображено на рисунке. Казалось бы распределение частот значений КД следует представлять в виде гистограммы? 5) Как следует из описания, рисунки 2.5, 2.6, 2.7, и 2.8 получены при помощи геном браузера UCSC. Вместе с тем, размер шрифта не позволяет прочесть названия треков. Автору стоило бы выбрать иной способ представления результатов или разбить эти рисунки на несколько панелей.

Также в диссертации имеется несколько грамматических и пунктуационных ошибок. Все перечисленные замечания не подвергают сомнению достоверность полученных результатов и обоснованность выводов, сделанных в диссертации, и не снижают ее научной значимости.

**Заключение.** Диссертационная работа Иванова Тимофея Михайловича на тему “Альтернативный сплайсинг тандемно дублированных экзонов”, представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук является законченной научно-квалификационной работой. Диссертационная работа 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 автор диссертации, Иванов Тимофей Михайлович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 — «математическая биология, биоинформатика». Доклад по диссертационной работе Иванова Тимофея Михайловича был заслушан, обсужден, и одобрен на заседании научного семинара в отделе вычислительной

системной биологии ИОГен РАН. На заседании присутствовали 6 человек. Результаты голосования: “за” – 6 человек, “против” – нет, “воздержались” – нет (протокол заседания №1 от 14.06.2022 г.). Основное направление научно-исследовательской работы отдела соответствует тематике диссертационной работы.

С.н.с. системной биологии и вычислительной генетики ИОГен РАН  
к.ф.-м.н., Урошлев Л.А.

Подпись  
удостоверяю

Зам. директора  
по научной работе



Столповский Ю.А.

Адрес организации:  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей  
генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук  
119991, г. Москва, ГСП-1, ул.Губкина, д.3  
Тел.: (499) 135-62-13  
Эл. почта: iogen@vigg.ru

Электронный адрес составителя отзыва:  
Урошлев Л. А. LeonidUroshlev@gmail.com

3 ноября, 2022