

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.101.01
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 28 ноября 2022 года протокол № 9

О присуждении Иванову Тимофею Михайловичу,
гражданину Российской Федерации,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Альтернативный сплайсинг тандемно дублированных экзонов» по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика, принята к защите 12 сентября 2022 года, протокол № 8, диссертационным советом 24.1.101.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института 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 **Иванов Тимофей Михайлович**, гражданин РФ, 1992 года рождения, в 2016 году окончил факультет ФНБИК Московского физико-технического института (Физтех) по специальности «Прикладная математика и информатика». В период подготовки диссертации Иванов Тимофей Михайлович обучался в

очной аспирантуре Сколковского института науки и технологий (2017–2021 гг.) в центре наук о жизни. В настоящее время не работает.

Диссертация выполнена в центре наук о жизни Сколковского института науки и технологий.

Научный руководитель – Первушин Дмитрий Давидович, кандидат физико-математических наук, старший преподаватель Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Официальные оппоненты:

Мошковский Сергей Александрович, гражданин РФ, доктор биологических наук, заведующий лабораторией протеогеномики в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства.

Раменский Василий Евгеньевич, гражданин РФ, кандидат физико-математических наук, руководитель лаборатории геномной и медицинской биоинформатики в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки "Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины" Минздрава России,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук дала положительное заключение, подписанное кандидатом биологических наук Урошлевым Леонидом Андреевичем, научным сотрудником лаборатории системной биологии и вычислительной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, и утвержденное кандидатом биологических наук Брускиным Сергеем Александровичем, заместителем директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук. В заключении содержится ряд замечаний:

1) Вторая глава диссертации посвящена анализу представленности тандемных 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.

Несмотря на замечания, **в отзыве содержится высокая оценка научного уровня диссертационной работы и отмечено, что «Все перечисленные замечания не подвергают сомнению достоверность полученных результатов и обоснованность выводов, сделанных в диссертации, и не снижают научную значимость работы».** В заключении отзыва указано, что «Диссертационная работа Иванова Тимофея Михайловича на тему “Альтернативный сплайсинг тандемно дублицированных 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».

Соискатель имеет 3 статьи в российских и международных рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК, из них 3 статьи по теме диссертации, общим объемом 38 страниц. Кроме того, соискателем опубликовано 4 тезиса по теме

диссертации в материалах российских и международных конференций.

Статьи по теме диссертации:

1. **Ivanov, T.M.**; Pervouchine, D.D., An Evolutionary Mechanism for the Generation of Competing RNA Structures Associated with Mutually Exclusive Exons. *Genes* 2018, 9, 356. (импакт-фактор журнала: 4.141)

2. **Ivanov T.M.**, Pervouchine D.D., Tandem Exon Duplications Expanding the Alternative Splicing Repertoire. *Acta Naturae*. 2022 Jan-Mar; 14(1): 73-81. (импакт-фактор журнала: 1.845)

3. Kalinina M, Skvortsov D, Kalmykova S, **Ivanov T.M.**, Dontsova O, Pervouchine DD. Multiple competing RNA structures dynamically control alternative splicing in the human ATE1 gene. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(1): 479-490.. (импакт-фактор журнала: 16.97)

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

На диссертацию поступило 2 отзыва на автореферат.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что за последние годы ими было опубликовано большое количество научных работ в области биоинформатики, геномики и популяционной генетики, в том числе по темам, относящимся к тематике диссертации.

В отзыве оппонента Мошковского Сергея Александровича, доктора биологических наук, заведующего лабораторией протеогеномики в ФГБУ Федеральный научно-клинический центра физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства в целом давшего работе высокую оценку и рекомендовавшего диссертацию к защите, отмечены недочеты:

1) На стр. 56 описываются методы оценки свободной энергии взаимодействия РНК. В частности, упоминаются программы RNAcup 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 Ate1, 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, замечен 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.

Однако в отзыве отмечено, что «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.». В заключении отзыва указано, что «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».

В отзыве оппонента Раменского Василия Евгеньевича, кандидата физико-математических наук, руководителя лаборатории геномной и медицинской биоинформатики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России, в целом дана высокая оценка работе, но имеется ряд замечаний и вопросов:

Диссертационная работа написана весьма грамотно и обстоятельно, практически не содержит опечаток, за редкими исключениями, например, «сакромерный» (стр. 45).

Тем не менее, работа содержит ряд стилистических шероховатостей, иногда затрудняющих понимание смысла, например, на стр. 12: «каждая из копий накапливает вредные мутации до тех пор, пока дефекты дополняются другой копией». Или на стр. 13: «приобретение новой функции под давлением отбора, заключающимся в наличии двух копий региона». На стр. 37: «Таким образом, с одной стороны ВИЭ часто образуются в результате тандемных дупликаций, а с другой стороны их сплайсинг регулируется конкурирующими структурами РНК. В связи с этим возникает вопрос, не связаны ли друг с другом тандемные дупликации экзонов, взаимоисключающий сплайсинг и конкурирующие структуры РНК, и нет ли общего молекулярного механизма, связанного с природой геномных дупликаций, который может быть ответственен за связь между всеми тремя явлениями. Получению ответа на этот вопрос и посвящена настоящая диссертационная работа». Из первой фразы следует, что связаны, поэтому вторая фраза — в которой установление этой связи входит в постановку диссертационной задачи — несколько сбивает с толку.

Автор пренебрегает правилом написания названий генов человека курсивом и заглавными буквами (например, стр. 7: «сплайсинг экзонов в гене *Ate1* человека»), что в некоторых случаях не позволяет понять, идет ли речь о гене человека или ортологе. Например, на стр.25, описывается ген *mrg* дрозофилы, затем автор пишет: «ген *mrg* сплайсируется альтернативно с большей частотой в опухолях яичников, чем в контрольных нормальных тканях».

Другой пример на стр.17: «Например, заболевание, связанное с МУН9 (МУН9-related disease, МУН9RD), представляет собой редкое аутосомно-доминантное заболевание, вызванное мутациями в гене *myh9*, кодирующем тяжелую цепь немышечного миозина IIА».

В отзыве отмечено, что «Приведенные выше замечания не снижают научный уровень и практическую ценность рецензируемой работы. Описанные выше незначительные недостатки текста работы, очевидно, объясняются необходимостью вместить много информации в ограниченный по объему текст. Необходимо отметить большой объем исследований, проведенных диссертантом и описанных в работе, разнообразие используемых методов, большое количество и сложность иллюстративного материала в диссертации. Автореферат и опубликованные статьи в полной мере отражают содержание диссертации».

В заключение отзыва указано, что «Актуальность темы, степень обоснованности выводов и научных положений работы, достоверность и новизна результатов позволяют заключить, что «Альтернативный сплайсинг тандемно дублицированных экзонов» представляет собой законченную диссертационную работу высокого уровня. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации к кандидатским диссертациям, а её автор Тимофей Михайлович Иванов несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8. – математическая биология, биоинформатика».

В отзыве на автореферат Артамоновой Ирины Игоревны, старшего научного сотрудника, руководителя группы биоинформатики отдела вычислительной системной биологии

ИОГен РАН, кандидата биологических наук, дана высокая оценка работы, но указаны недочеты:

– из недостатков следует отметить чрезвычайно мелкий шрифт на некоторых картинках, особенно в примерах тандемных дупликаций в нетранслируемых областях.

– использование отдельных неудачных, на мой взгляд, выражений, без изменений повторяющих англоязычные термины. Например, в работе используется выражение «геном браузер» – оборот «геномный браузер» звучит значительно лаконичнее.

В конце отзыва указывается, что «Использованные в работе методы не вызывают сомнения, а полученные результаты являются достоверными. Таким образом, представленный автореферат свидетельствует, что обсуждаемая диссертационная работа полностью удовлетворяет требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Иванов Тимофей Михайлович, заслуживает присуждения соответствующей ученой степени».

В отзыве на автореферат Жариковой Анастасии Александровны, старшего преподавателя ФББ МГУ дана высокая оценка работы, но приводится вопрос:

Работа вызывает очень приятное впечатление, по тексту есть небольшой уточняющий вопрос. Тандемные дупликации экзонов в данной работе были исследованы в генах человека, *D. melanogaster* и *C. elegans*. Чем обусловлен выбор именно этих организмов?

В конце отзыва указывается, что «Диссертационная работа Иванова Тимофея Михайловича полностью удовлетворяет требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Иванов

Тимофей Михайлович, заслуживает присуждения соответствующей ученой степени».

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

впервые показано, что тандемные дубликации экзонов широко распространены не только в кодирующих, но также и в нетранслируемых областях генов животных;

получено описание неизвестных ранее тандемных дубликаций экзонов в геноме человека с указанием степени консервативности их последовательностей и уровня экспрессии в тканях;

впервые показано, что интроны в кластерах взаимоисключающих экзонов склонны образовывать конкурирующие структуры РНК, состоящие из докерного и множества селекторных сайтов;

впервые выдвинута гипотеза о том, что тандемные дубликации, 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, ответственные за взаимоисключающий сплайсинг экзонов 7a и 7b гена *ATE1* человека.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

В нём высказано предположение о закономерном возникновении конкурирующих структур РНК в результате тандемных дубликаций, которое приводит к общему знаменателю и обобщает все известные на данный момент случаи регуляции взаимоисключающего сплайсинга такими структурами.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что с практической точки зрения, высказанное обобщение о регуляции взаимоисключающего сплайсинга посредством конкурирующих структур РНК, 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 7а и 7б 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.

Свидетельства достоверности результатов исследования:

Достоверность результатов о роли тандемных дупликаций в образовании конкурирующих структур РНК подтверждается тем, что они, с одной стороны, хорошо согласуются со всеми известными из литературы 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. Предсказания существования неаннотированных случаев дубликаций экзонов подтверждаются данными высокопроизводительного 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.

Личный вклад соискателя состоит в активном участии в разработке плана исследования, получении доступа к данным высокопроизводительного секвенирования РНК и их обработке, выполнении исследования, а также в планировании экспериментальных работ по материалам данной диссертационной работы. Представленные результаты получены автором лично.

Диссертационный совет пришел к выводу, что диссертация представляет собой завершенное научное исследование. По актуальности, новизне, практической значимости диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

На заседании 28 ноября 2022 года диссертационный совет принял решение присудить Иванову Тимофею Михайловичу ученую степень кандидата биологических наук по

специальности «1.5.8.» – математическая биология, биоинформатика.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 10 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали за – 14, против – 0, недействительных бюллетеней – 0

Председатель

диссертационного совета 24.1.101.01

д.б.н., профессор

М.С. Гельфанд

Ученый секретарь

диссертационного совета 24.1.101.01

д.б.н.

О.В. Казенников



28 ноября 2022 г.