

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
доктора химических наук Первушина Дмитрия Давидовича  
на тему: «Альтернативный сплайсинг и дальние взаимодействия в  
структуре эукариотических РНК»  
по специальности 1.5.3. Молекулярная биология**

**Актуальность темы диссертационной работы.** Диссертационная работа Первушина Дмитрия Давидовича посвящена изучению механизмов альтернативного сплайсинга (АС), в том числе регулируемых дальними взаимодействиями в структуре эукариотических РНК, с помощью комбинированных биоинформатических и экспериментальных методов. Актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнения, поскольку АС является одним из важнейших механизмов регуляции экспрессии генов и является на данный момент недостаточно изученным. В ходе АС увеличивается не только разнообразие конечных транскриптов и белковых продуктов, кодируемых генами, но и, как теперь становится понятным, осуществляется тонкая регуляция работы клеток, в том числе тканеспецифичная. АС играет важнейшую роль в дифференцировке тканей, более двух третей событий АС имеют тканеспецифичные различия, а мажорная сплайс-изоформа варьируется в зависимости от условий более чем в 60% кодирующих генов. Таким образом, альтернативный сплайсинг является одним из ключевых механизмов, посредством которого в природе происходила эволюция «сложных» организмов, включая эволюцию человека. Участие АС в «тонкой» регуляции работы генома обуславливает его вовлеченность в патогенез значительной доли наследственных заболеваний человека. Показательным фактом, подчеркивающим практическую актуальность исследований АС, является ведущаяся разработка и применение ряда лекарственных препаратов,

воздействующих на механизмы АС (например, препарат Спинраза на основе антисмысловой РНК).

### **Структура и содержание диссертации.**

Работа написана хорошим понятным языком, легко читается и практически не содержит опечаток, сверстана в системе LaTeX, обладает удобным интерактивным оглавлением, изложена на 248 страницах в виде шести глав, включает 57 рисунков и восемь таблиц. Диссертация изложена по классической схеме, материалы и методы выделены в отдельную главу.

Во введении автором изложены формальные разделы, связанные с описанием актуальности, новизны, значимости исследования, заявлены цели и задачи диссертационной работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, приведена информация об апробации работы.

Глава 1 «Обзор литературы» посвящена подробному изложению современных представлений об альтернативном сплайсинге и методах определения и предсказания структуры РНК, обсуждается роль АС в заболеваниях человека и применение антисмысловых олигонуклеотидов для модуляции АС.

Глава 2 «Материалы и методы» состоит из четырех частей. В первой части представлена информация об экспериментальных методах, используемых в работе. Во второй и третьей части обсуждаются источники данных секвенирования и методы обработки данных секвенирования. Четвертая часть посвящена изложению биоинформатических методов.

Глава 3 «Предсказание дальних взаимодействий в структуре РНК» посвящена разработанным автором алгоритмам поиска консервативных комплементарных участков (ККУ) в последовательностях генов. Поиск ККУ, находящихся на значительном расстоянии друг от друга, является

нетривиальной задачей с математической точки зрения. Автором представлены оригинальные программы и алгоритмы, в частности IRBIS и PREPH, позволяющие практически образом решать задачи поиска ККУ, используя данные о консервативности участков и компенсаторных мутациях. Использование данных алгоритмов проиллюстрировано их применением к конкретным биологическим задачам, в результате которого были получены новые научные результаты. В частности, интересной является высказанная гипотеза о котранскрипционном подавлении преждевременного полиаденилирования структурой РНК, когда сайты полиаденилирования в интронах благодаря структуре РНК котранскрипционно вырезаются сплайсингом и не вызывают преждевременной терминации транскрипции.

Глава 4 «Структура и конформационное секвенирование РНК» посвящена изложению результатов полученным методом RIC-seq в результате их анализа разработанным вычислительным конвейером RNAcontacts. В результате была показана согласованность биоинформатических предсказаний методом PREPH и экспериментальных данных.

Глава 5 «Экспериментальная валидация влияния структуры РНК на АС» является одной из самых интересных, в ней продемонстрирован ряд открытий сделанных методами биоинформатики, которые были подтверждены экспериментально. На наборе генов дрозофилы и млекопитающих был продемонстрирован целый ряд механизмов регуляции АС с помощью ККУ. На примере генов *Nmnat*, *CASK*, *RNF20L1*, и *ATE1*, показано, что дальние взаимодействия в структуре РНК могут простираются на десятки тысяч п.о., а образуемые ими петли могут изменять соотношение сплайс-изоформ, управлять включением кассетных экзонов и даже влиять на полиаденилирование. Показано, что скорость транскрипции влияет на удержание тех или иных экзонов. Экспериментально продемонстрировано, что

может быть выполнен дизайн антисмысловых олигонуклеотидов, которые на моделях минигенов управляют процессами АС.

Глава 6 «Регуляция непродуктивного сплайсинга РСБ и структурой РНК» посвящена изучению процессов регуляции непродуктивного сплайсинга, использующего механизм нонсенс-опосредованного распада. На примере генов DCLK2, IQGAP1, BRD2 и BRD3 показана регуляция непродуктивного сплайсинга фактором РТВР1 и дальними взаимодействиями в структуре РНК. Особо интересным является открытый автором набор ядовитых регуляторных экзонов в генах семейства ВЕТ.

В заключении приводятся основные выводы диссертационной работы.

В целом диссертационная работа производит очень положительное впечатление, как по объему выполненных работ, научной и методологической значимости, так и по качеству ее оформления и подаче материала. **Научная новизна диссертационной работы** не вызывает сомнений, исследования, проведенные автором, находятся на передовом крае науки. Автором выявлены новые закономерности общего характера в механизмах альтернативного сплайсинга, охарактеризованы новые регуляторные элементы функционирования генома на основе консервативных комплементарных участков РНК в целом ряде генов. Кроме этого, существенная новизна связана с разработанными автором алгоритмами поиска ККУ. Алгоритмы IRBIS и PREDH являются взаимодополняющими и могут идентифицировать различные группы ККУ.

**Теоретическая и практическая значимость работы** связана с главным образом с установлением новых механизмов, регулирующих экспрессию и структуру генов, а также с разработкой подходов по применению антисмысловых олигонуклеотидов по управлению альтернативным

сплайсингом. Данные подходы могут лечь в основу терапий ряда заболеваний. Автором уже получен патент «Система направленного изменения сплайсинга в гене MARK2», в основе которого лежит действие антисмысловых олигонуклеотидов на структуру РНК. Понимание механизмов АС закладывает рациональные основы для понимания патогенеза ряда наследственных и онкологических заболеваний, разработки подходов к их лечению.

Диссертационная работа обладает высокой **степенью обоснованности и достоверности выводов**, которая обеспечивается комбинацией при исследованиях целого набора современных экспериментальных и вычислительных подходов (в частности, анализом геномных данных из проектов ENCODE и GTEx, проведении экспериментов RIC-seq, экспериментов по модуляции сплайсинга антисмысловыми РНК), проведении необходимого количества подтверждающих экспериментов и контрольных анализов, сравнением с литературными данными, а также подтверждается публикацией результатов в ведущих рецензируемых журналах. Автором опубликовано по теме диссертации 33 статьи, в ведущих мировых журналах, включая такие журналы, как Nature Communications, Nucleic Acids Research, Genome Biology, RNA и др. Кроме того, Д.Д. Первушин являлся соавтором целого ряда статей в журналах Nature и Science, в которых были опубликованы результаты работы международного консорциума ENCODE. Результаты работы были доложены более, чем на 25 международных конференциях.

Текст диссертации и представленные в нем данные полностью обосновывают сделанные в работе выводы и выносимые на защиту положения. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание.

Представленная работа является фундаментальным законченным исследованием, которое является определяющим для формирования

передового направления науки – изучения механизмов функционирования и регуляции альтернативного сплайсинга.

В то же время к работе можно выдвинуть ряд замечаний и пожеланий:

- Использование в тексте диссертации для обозначения 5' и 3' концов ДНК символа апостроф вместо символа штриха.

- Излишнее использование англицизмов, например, слова «пробинг», «валидация» и д.р.

- Некоторые опечатки, например дубликация фразы «как правило» на стр. 104.

- Первое положение, выносимое на защиту, могло бы быть сформулировано четче. Не указано, что речь идет о комплементарных участках олигонуклеотидных последовательностей, которые взаимодействуют друг с другом. Термин «поддержка консервативных участков» также оставляет простор для трактовки этого утверждения.

- В части обора литературы, на взгляд, рецензента не хватает более подробного описания современных представлений о том, как устроен альтернативный сплайсинг, не приведены общие схемы процесса, структуры сплайсосомы и т.д.

- В разделе 1.1. автор утверждает, что «В регуляции АС принимают участие более полутора тысяч РНК-связывающих белков (РСБ)». По данным базы Quick GO количество канонических изоформ белков человека имеющих статус UniProt Reviewed и при этом аннотированных тэгом RNA splicing или дочерними, составляет 376 (общее количество аннотаций составляет 1282). Как автор может объяснить данное противоречие? Включение в рассмотрение неканонических сплайс-изоформ белков также не увеличивает их количество до полутора тысяч.

- Хотелось бы узнать мнение автора относительно следующего вопроса: методы динамического программирования не позволяют находить дальние взаимодействия в ДНК/РНК из-за их шунтирования псевдоузлами, в то же время существуют алгоритмы типа BLAST которые позволяют искать локальные совпадения между последовательностями. В чем проблема применения такого рода алгоритмов для поиска дальних взаимодействий? Что будет, если с помощью BLAST сделать выравнивание пре-мРНК с обратно комплементарной пре-мРНК, ограничив поиск консервативными участками? В чем преимущество алгоритмов, разработанных автором?

- Известно, что РНК-триплексы играют определенную роль в катализе сплайсинга. Могут ли такие «тройные» взаимодействия выполнять регуляторную роль подобно ККУ?

- Работа автора связана с поиском высокоэнергетических участков образования РНК дуплексов. Некоторым авторами высказываются идеи о том, что субкомплементарные низкоафинные РНК/РНК РНК/ДНК взаимодействия могут играть важную биологическую роль (см. например, 10.1038/s41557-022-01111-y). Каково мнение автора на этот счет?

- Существуют работы, демонстрирующие важную регуляторную роль Z-форм РНК, в частности, вероятно, формируемыми при сворачивании мРНК, содержащей ретроэлементы (см. например, 10.1261/rna.079429.122). Могут ли ККУ регулирующие сплайсинг принимать Z-форму? Может ли это быть важным в регуляции сплайсинга?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации

соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Первушин Дмитрий Давидович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

#### **Официальный оппонент**

Шайтан Алексей Константинович  
доктор физико-математических наук,  
член-корреспондент РАН,  
профессор кафедры биоинженерии биологического факультета  
Федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования  
«Московский государственный университет  
имени М. В. Ломоносова»

16 сентября 2024 г.