Отзыв официального оппонента
на диссертацию Шендер Виктории Олеговны на тему «Использование омиксных технологий для изучения особенностей коммуникации между клетками злокачественных опухолей», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - «биоорганическая химия»

Несмотря на прогресс в понимании механизмов злокачественной трансформации клеток, а также постоянное появление новых стратегий лечения онкозаболеваний, в этой области исследований все еще много неясных вопросов. Одним из ключевых является вопрос о механизмах приобретаемой раковыми клетками резистентности к химио- и/или радиотерапии. Важно, что речь в данном случае идет не только о конвенциальной терапии с использованием ДНК-повреждающих агентов, но и о комбинаторной химиотерапии и молекулярно-направленной (таргетной) терапии. Например, известно, что резистентность может развиваться даже в ответ на терапию BRCA-дефицитных форм рака молочной железы или яичников ингибиторами поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), основанную на принципе синтетической летальности. Что же касается традиционной химиотерапии, то развитие резистентности, вероятно, является одной из самых существенных проблем на пути к повышению долгосрочной эффективности лечения. Известно несколько принципиальных механизмов развития химиорезистентности раковых клеток. При этом, стоит отметить, что далеко не для всех типов химиопрепаратов эти механизмы описаны в достаточной степени. Более того, даже наиболее изученные случаи развития резистентности к химиопрепаратам не дают четкого понимания этого феномена. В последние годы, стало очевидно, что проблема химиорезистентности тесно связана с обнаруженной высокой гетерогенностью опухолей (популяций раковых клеток). Такая генетическая и фенотипическая гетерогенность может напрямую влиять как на первичный ответ опухоли на терапию, так и на выживаемость отдельных раковых клеток/клонов и/или развитие химиорезистентности. Все сказанное выше обусловливает актуальность и практическую значимость работы В.О. Шендер, посвященной исследованию межклеточной коммуникации опухолевых клеток и роли такой коммуникации в развитии резистентности к химиопрепаратам.

Диссертационная работа объемом 142 страницы включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть (материалы и методы)», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», «Приложение». В диссертации процитировано 222 работы; работа содержит 52 рисунка, 9 таблиц и 7 приложений.

Обзор литературы состоит из 4 основных частей, планомерно подводящих читателя к постановке экспериментальных задач. Первые два, достаточно коротких, раздела посвящены обзору основных известных механизмов развития резистентности раковых клеток к химиопрепаратам. В третьем, основном, разделе обзора литературы речь идет о механизмах межклеточной коммуникации раковых клеток, роли белков, нуклеиновых кислот и различных клеточных метаболитов в такой коммуникации. Эта часть обзора производит очень цельное впечатление и, на мой взгляд, может быть опубликована в виде обзорной статьи. В последнем четвертом разделе описываются омиксные (протеомные и метаболомные) подходы к исследованию межклеточной коммуникации. Включение этого раздела в обзор литературы, по-моему, очень удачный шаг, который существенно облегчает восприятие экспериментальных данных, представленных в диссертации. В целом, обзор литературы написан хорошим языком, очень логично, хорошо иллюстрирован и содержит необходимые сведения для понимания представленных в работе экспериментальных данных. Несмотря на то, что обзор литературы заканчивается небольшим заключением, удачным было бы в нем привести и обосновать экспериментальные задачи настоящей работы.

Раздел «Материалы и методы» написан очень подробно. Ознакомление с этим разделом позволяет воспроизвести использованные автором методы без привлечения специальной литературы. Несомненно, автор является высококвалифицированным исследователем, владеющим большим арсеналом современных методов. Важно, на мой взгляд, отметить определенный универсализм автора, который следует из списка методов – автор владеет как методами молекулярной биологии и биохимии, так и методами клеточной биологии и биоинформатического анализа данных.

Экспериментальные результаты работы изложены в виде трех обособленных, но логически связанных, глав в разделе «Результаты и обсуждение». Мне бы хотелось особо

отметить логичность планирования исследования и представления результатов в целом. Автор сначала находит определенный феномен, в данном случае участие сплайсосомных белков и нуклеиновых кислот в межклеточной коммуникации и развитии химиорезистентности, при сравнении образцов, полученных от пациентов (глава 1). После этого пытается удостовериться в том, что феномен характерен и для моделей культур опухолевых клеток, и, используя эти культуры клеток, детально исследовать механизмы участия компонентов сплайсосом в коммуникации клеток (глава 2). В завершении предпринимается попытка выяснить роль нуклеинового компонента сплайсосом в развитии химиорезистентности с использованием синтезированных in vitro мяРНК (глава 3). В этом контексте вызывает некоторое недоумение название диссертации, в котором акцент сделан на использовании омиксных технологий. Действительно, омиксные технологии были не только использованы в данной работе, но и существенным образом оптимизированы для эффективного анализа, в частности, сложных смесей белков (асцитов). Однако, на мой взгляд, более важно то, что в работе был описан и изучен важный с биологической точки зрения феномен участия компонентов сплайсосом в межклеточной коммуникации опухолевых клеток и развитии химиорезистентности.

К наиболее важным результатам работы можно отнести, в частности, сравнительный анализ секретомов опухолевых клеток до и после химиотерапии. Такой анализ был проведен автором как in vitro (с использованием клеточных культур), так и in vivo (с использованием асцитных жидкостей пациентов). При этом стоит отметить, что парный анализ асцитов одних и тех же пациентов до и после курса химиотерапии, наверное, является в данный момент уникальным. Автором убедительно показано, что клетки аденокарциномы яичника в ответ на химиотерапию цисплатином начинают секретировать компоненты сплайсосомы, причем как белки, так и мяРНК. Автором было впервые показано, что секретомы опухолевых клеток могут стимулировать развитие химиорезистентности и приобретение более агрессивного мезенхимального фенотипа реципиентными раковыми клетками. Важно отметить, что роль мяРНК в процессах развития резистентности и дальнейшего «озлокачествления» раковых клеток был показан и в прямых экспериментах. Был проведен анализ влияния синтезированных аналогов двух мяРНК на транскриптом и протеом опухолевых клеток. По

моему мнению, эта диссертационная работа по всем параметрам (постановка задачи, полученные результаты, представление данных) превосходит средний уровень работ, защищаемых на соискание ученой степени кандидата наук. Тем не менее, у меня есть небольшие замечания и вопросы.

Так, на рисунках 9 и 13 не лишним было бы привести загрузочный (loading) контроль.

Не очень понятна логика представления некоторых результатов в Приложении, а не в основном тексте. Например, рисунки в Приложениях 3 и 5 вполне гармонично смотрелись бы и в тексте.

На рисунке 38 интерес вызывает обогащение EU-меченой РНК в ядрышках клеток-реципиентов. Автор связывает такую локализацию с тем, что в везикулах содержатся не только мяРНК, но и мяоРНК. Можно ли полностью исключить возможность попадания в реципиентные клетки самого предшественника (EU) и включение его в ходе транскрипции в клетках-реципиентах?

Раздел 3.2.4.1. и таблица 8. Интересно было бы знать, насколько пересекаются списки дифференциально экспрессирующихся генов (в образцах, трансфецированных U12, U6 и GFP).

Раздел 3.2.4.2. (с. 115). Автор пишет, что «среди дифференциально повышенных белков в клетках, трансфицированных как U12, так и U6atac мяРНК, одни из самых значимых отличий наблюдались для кластеров регуляции клеточного цикла, а также митотической фазы клеточного цикла...». Было бы правильно провести такой же анализ и белков, дифференциально повышенных в клетках, которые трансфецировали фрагментом РНК GFP. Особенно, если учесть, что таких белков не меньше (347), чем белков, дифференциально повышенных в клетках, которые трансфецировали синтезированными мяРНК.

Тот же раздел, рис. 52. На рисунке не хватает распределения по клеточному циклу контрольной группы клеток. В связи с этим не ясно, каково влияние трансфекции клеток экзогенными РНК.

Кроме того, из данных, представленных на этом рисунке, следует, что трансфекция U12 приводит к существенному изменению клеточного цикла и, по всей видимости, к G2-аресту клеток. Поэтому, возможно, что наблюдаемые автором изменения в транскриптоме и

протеоме этих клеток (обогащение по генам, вовлеченным в регуляцию клеточного цикла и митоз) является вторичным следствием влияния экзогенных мяРНК на какие-то другие процессы, приводящие к изменениям клеточного цикла.

Должен отметить, что сделанные замечания не влияют на общее очень хорошее впечатление от работы. В целом, диссертация написана логично и понятно. Все полученные данные оригинальны и, безусловно, будут интересны широкому кругу молекулярных и клеточных биологов. Обоснованность выводов, сделанных на основании полученных результатов, сомнений не вызывает. Автореферат полностью отражает существо работы. По теме диссертации автором опубликовано 5 научных статей, в том числе две в журнале Molecular and Cellular Proteomics (IF > 5).

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. № 650), а ее автор, Шендер Виктория Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент:
заведующий лабораторией стабильности генома
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН),
доктор биологических наук (по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»)

Омар Леванович Кантидзе

18.09.2018

Контактные данные:
Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
Сайт: www.genebiology.ru
Тел.: (499)135-97-87
E-mail: kantidze@gmail.com

ПОДПИСЬ Кантидзе О.Л
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИБГ РАН Набирочкина Е.Н.