

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Марата Самвеловича Павлюкова «Роль апоптоза в трансформации опухолей: новые подходы к терапии глиом», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология

На протяжении многих лет сложности с лечением онкологических заболеваний связывали с генетической гетерогенностью опухолей, возникающей в процессе ее развития. Однако в последнее время благодаря развитию метода сиквенирования нуклеиновых кислот индивидуальных клеток удалось обнаружить, что устойчивость отдельных раковых клеток к лечению обусловлена изменениями не только в геноме, но и благодаря изменению в транскрипции. Как происходят эти изменения неизвестно, а отсюда возникает неопределенность с методами лечения таких заболеваний.

Диссертационная работа М.С. Павлюкова посвящена как раз изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе приобретения устойчивости раковых клеток под действием внешних воздействий и по крайней мере частично раскрывает молекулярные механизмы такого приобретения, что несомненно относится к самому передовому развитию молекулярных основ современной онкологической науки.

Она написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, методической части, описания научных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, состоящим из 216 источников. Материал диссертации изложен на 219 страницах и иллюстрирован 3 таблицами и 110 рисунками. Рецензируемая работа представляет собой экспериментальное исследование, отличающееся актуальностью поставленной проблемы и четкой логикой экспериментальных подходов.

Во введении рассмотрена актуальность темы и сформулированы цели и задачи исследования. В литературном обзоре последовательно рассмотрены как внутриклеточные механизмы, лежащие в основе развития апоптоза, так и молекулы - участники ингибирования апоптоза, используемые раковыми клетками для сохранения своей жизнеспособности. Литературный обзор как и вся диссертация вместе с авторефератом написаны очень хорошим литературным языком и потому читаются легко читаются и с большим интересом. К литературному обзору имеется два замечания.

1. В заключительной части следовало более развернуто, чем во введении сформулировать цели и задачи исследования, что способствовало бы лучшему пониманию логики работы.

2. Экзосомам животных клеток в заключительной части обзора уделено слишком мало внимание и потому при чтении диссертации складывается впечатление, что о них мало что известно. Однако это не совсем верно, их интенсивное изучение началось с 2005-2006 годов, когда выяснилась их способность переносить мРНК и микроРНК между клетками. В обзоре по экзосомам, появившемся в 2017 году (Trends Cell Biol . 2017 March ; 27(3): 172–188) фигурирует уже 140 ссылок. Чрезвычайно важно, что к настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал, указывающий, главное, на целенаправленную упаковку содержимого экзосом, осуществляемую животными клетками, и в настоящее время мировое научное сообщество принимает экзосомы за универсальное средство межклеточного сообщения.

В методическом плане диссертация М.С. Павлюкова чрезвычайно разнообразна, сочетающая в себе методы молекулярной биологии, биохимии, физиологии и онкологии. Полагаю, что именно использование самых разнообразных методов позволило диссертанту получить множество интересных результатов. Методическая часть занимает по объему почти четверть всего текста и это при том, что большинство использованных методов описано очень кратко. Хочу при этом заметить, что автору в методической части удалось соблюсти баланс при описании разработанных им методик и общеизвестных. Серьезных замечаний к методической части не имеется.

Прежде чем переходить к анализу основной части работы хочу отметить одну ее особенность. Обычно начало любого исследования начинается с анализа научной литературы, а далее оно может развиваться двумя путями. По одному, исследователь сначала намечает эксперименты, которые следует выполнить в дополнение к уже имеющимся, чтобы впоследствии сделать ряд обобщений. По другому, сначала на основе анализа научной литературы выстраивается научная концепция или гипотеза, в соответствие с которой планируется вся дальнейшая экспериментальная работа. Очевидно, что второй путь более плодотворен и именно его использовал М.С. Павлюков в своей работе.

Так, например, при изучении роли белка AIF в регуляции каспазезависимого апоптоза было предположено автором, что этот белок закреплен на наружной митохондриальной мембране (НММ) с помощью белка-адаптера и что нарушение этого взаимодействия является предопределяющим для начала реакции апоптоза. С использованием большого арсенала современных методов М.С. Павлюкову удалось идентифицировать Морталин как такой белок-адаптер, установить участки его структуры, ответственные за взаимодействие с НММ и с AIF и, главное, показать существование

связи между уровнем экспрессии Морталина и выживаемостью пациентов с опухолями головного мозга.

В основе работы с белком Сурвивином автором была предложена гипотеза о том, что в отличие от широко распространенного мнения о роли димера этого белка как ингибитора апоптоза, основную роль в ингибировании может играть и мономер. Ингибирование апоптоза Сурвивином начинается с его взаимодействия с белком Smac/DIABLO. В результате использования техники фотообесцвечивания акцептора FRET было показано, что мутант Сурвивина, не способный к димеризации, взаимодействует с Smac/DIABLO. Далее с использованием РНК интерференции и клеточные линии, экспрессирующие различные мутанты Сурвивина, М.С. Павлюкову удалось получить убедительные доказательства участия именно мономера в ингибировании апоптоза и в определяющей роли в этом процессе участка димеризации Сурвивина. Полученный результат, с одной стороны, полностью перевернул представления о механизме действия Сурвивина, с другой стороны, создал перспективы для создания новых лекарств в онкологии, основанных на вмешательстве в молекулярный механизм димеризации Сурвивина, и которыми автор в дальнейшем успешно воспользовался.

Благодаря вдумчивому подходу автора к механизму развития апоптоза, в частности к возможному участию в нем перекисного окисления липидов, им было обращено внимание на белок Параоксаназу 2 (PON2). В результате проведенного многостороннего изучения PON2, распространенности этого белка в разных видах опухолей, установлении локализации этого белка по компартментам клетки, вполне правдоподобным выглядит вывод автора о вкладе PON2 в выживаемость солидных опухолей, подвергнутых внешнему воздействию. Проявленная изобретательность в конструировании рекомбинантной Трансглутаминазы 2 (TGM2) и изучение клеток с ее экспрессией позволила разрешить существующие противоречия в научной литературе о механизме активации TGM2 при апоптозе.

Заслуживает большой похвалы проявленная настойчивость автора диссертации в практической реализации полученных фундаментальных знаний о молекулах-участников апоптоза, в результате чего удалось создать несколько принципиально новых противоопухолевых препаратов, вызывающих гибель стволовых клеток глиобластомы при относительно низких концентрациях. Это модифицированный ингибитор киназы СМР3а и два низкомолекулярных ингибитора, LLP3 – ингибитор димеризации Сурвивина и GA11 – ингибитор альдегид дегидрогеназы ALDH1A3. Высокая избирательность их действия по отношению к стволовым клеткам глиобластомы и относительно низкие действующие

их концентрации предопределяет хорошие перспективы для использования созданных препаратов на практике при лечении онкологических заболеваний.

Наиболее значимые результаты диссертационной работы были получены М.С. Павлюковым при исследовании роли апоптоза в развитии злокачественных заболеваний. Хочу сразу отметить, что уже только одного этого раздела диссертационной работы достаточно для присуждения ее автору докторской степени. При чтении этого раздела у меня постоянно возникал вопрос, как так получилось, что никто из ученых, специализирующихся в исследовании экзосом, не обнаружил ничего близкого, касающегося сплайсинга, являющегося отличительной чертой диссертационной работы М.С. Павлюкова. Следует иметь при этом в виду, что уже в 2008 году в журнале *Nature cell biology* (10(12), 1470) появилась на свет обширное исследование содержимого экзосом, выделяемых клетками глиобластомы, с привлечением методов NGS и масс-спектрометрии. И это далеко не единственная публикация на эту тему. Диссертант на мой вопрос ответил, что мало кто из ученых интересовался вопросом о том, что выделяет из себя клетка при апоптозе. Я полагаю, что причина более глубокая и заключается в том, что клетка при стрессовом воздействии, а апоптоз возникает как следствие стресса, видимо резко меняет состав компонентов в выделяемых экзосомах и потому анализ их содержимого по сравнению с аналогичным исследованием в контрольных условиях позволяет понять, что скрывается за изменениями в составе белков и нуклеиновых кислот, упакованных в экзосомы. Именно такой подход был применен диссертантом, в результате чего им получены необычайно интересные данные о том, как общение между раковыми клетками помогает им выжить в стрессовых условиях, создаваемых химио- или радиотерапией.

Итак, исследуя белковый состав асцитической жидкости пациентов с раком яичника, подвергнутых химиотерапии, т.е. фактически стрессовому воздействию на раковые клетки, неожиданно впервые обнаружилась в ее составе белки и U РНК сплайсосом. Далее диссертантом были получены результаты, указывающие на то, что эти компоненты сплайсосом упакованы в маленькие везикулы – экзосомы. Этот результат был подтвержден на солидной опухоли, глиобластоме., с которой было убедительно показано, что только везикулы апоптотических клеток апоEVs обогащены сплайсосомными белками и U РНК. Чтобы понять, что за всем этим скрывается, т.е. какова биологическая роль апоEVs, была выполнена блестящая серия методически разнообразных экспериментов, приведшая к получению потрясающего по силе результата: апоEVs меняют сплайсинг соседних выживших клеток, что приводит к мезенхимальной трансформации этих клеток глиобластомы и соответственно к

повышению их устойчивости к стрессовому воздействию. Проще говоря, благодаря внешнему воздействию на глиобластома, будь то химиотерапия или радиотерапия, образующиеся апоптотические клетки выделяют везикулы с содержимым, которое попадая в соседние клетки меняет в них транскрипцию, что повышает их устойчивость и способствует приобретению более агрессивного характера. Вероятно во всех клетках, и в раковых в частности, существует механизм направленного наполнения содержимого экзосом. Поскольку с этим процессом по результатам данной диссертации тесно связана выживаемость опухолевых клеток, то появляется возможность создания противоопухолевых препаратов, основанных на принципиально новом принципе - в нарушении механизма формирования апоEVs.

Диссертантом выполнены обширные исследования и получены результаты, указывающие на большую роль белкового фактора сплайсинга RBM11 в переходе клеток глиобластомы от пронеурального к мезенхимальному фенотипу. Находясь в логике собственных построений об исключительной роли сплайсосомных белков, упакованных в апоEVs, в повышении устойчивости соседних клеток, автор диссертации попытался получить доказательства, что наблюдаемые изменения в сплайсинге при изменении фенотипа стволовых клеток глиобластомы можно связать с переносом RBM11 от одних клеток в другие с помощью апоEVs. Для этого были специально получены клеточные линии с нокдауном и со сверхэкспрессией гена RBM11. И хотя полученные с этими линиями результаты не противоречат роли переноса экзосомами RBM11 в изменении фенотипа клеток глиобластомы, пока окончательно делать такой вывод преждевременно, поскольку как нокдаун гена, так и его сверхэкспрессия сопровождаются многочисленными изменениями в экспрессии других генов и поэтому следует с осторожностью интерпретировать получаемые результаты.

Если выйти из развиваемого автором представления об исключительной роли сплайсосомных белков, переносимых апоEVs, в фенотипическом переходе клеток глиобластомы, то основываясь на самих результатах диссертационной работы, можно увидеть другое объяснение наблюдаемого эффекта, а именно за счет изменения метилирования промотора гена RBM11. Автор диссертации показано, что в клетках пронеурального фенотипа промотор гена RBM11 почти сильно метилирован, тогда как в клетках мезенхимального фенотипа практически полностью деметилирован. Известно, что специфичность метилирования определяется не самими деметилазами, а их партерами, коими могут быть как белки, так и длинные некодирующие РНК. Поэтому вполне вероятно, что причина роста экспрессии гена RBM11 при переходе клеток глиобластомы

от пронеурального фенотипа к мезенхимальному заключается в переносе с помощью apoEVs одного из партнеров деметилаз.

Внимательно читая данный раздел диссертации я к сожалению не нашел ответа на очевидный вопрос: наблюдаемый эффект следует отнести к кросс-адаптации, при которой один вид стрессового воздействия увеличивает устойчивость к другому, или в данном случае проявляется и специфичность ответа. Если говорить о кросс-адаптации, тогда спрашивается, будет ли возрастать устойчивость опухоли к химиотерапии после радиационного ее облучения. Если же о специфичности, тогда возникает вопрос, будет ли, например, при терапии глиобластомы определенным химическим препаратом возрастать устойчивость именно к этому или и другим, отличающихся по механизму действия.

Каковы бы не были ответы на поставленные выше вопросы, полученные в диссертации результаты заставляют иными глазами посмотреть на интеллектуальные способности раковых клеток. С учетом того, что упаковка содержимым EVs является упорядоченным процессом, можно думать что раковые клетки способны анализировать происходящие внутри них изменения в метаболизме под действием терапии, способны принимать соответствующие решения для спасения своего сообщества и что они обладают механизмом для реализации принятого решения. И в таком случае мы видим, что сложность лечения ракового заболевания может определяться не только генетической гетерогенностью опухоли, но в значительной мере и интеллектом самих раковых клеток.

Заканчивая свой отзыв, хочу отметить еще одну особенность диссертационной работы М.С. Павлюкова. Выстраивая свои гипотезы, их автор делает обычно несколько предсказаний, которые затем последовательно все проверяет. Наблюдаемое на опыте совпадение предсказаний с реальными данными является очень сильным аргументом в достоверность получаемых результатов и в справедливость предложенных гипотез.

Тщательно проанализировав результаты диссертации М.С.Павлюкова и сделанные им выводы у меня нет никаких сомнений и даже скажу больше, сложилось твердое убеждение, что по актуальности, по методическому решению поставленных задач, по объему выполненной работы, по научно новизне и практической значимости, достоверности и важности основных выводов диссертационная работа Павлюкова Марата Самвеловича отвечает самым высоким требованиям, предъявляемым докторским диссертациям и несомненно соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а сам диссертант несомненно

заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности
03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент
главный научный сотрудник
лаборатории стрессоустойчивости растений
ФГБНУ ВНИИСБ

доктор биологических наук,
профессор

Бабаков Алексей Владимирович

Адрес: 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42.
Телефон: 8(499) 976-65-44
E-mail: avb@iab.ac.ru

Подпись д.б.н. Бабакова А.В. удостоверяю
Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ
к.б.н. Федина Е.И.
М.П.

