

## ОТЗЫВ

**Официального оппонента на диссертационную работу Павлюкова Марата Самвеловича "Роль апоптоза в трансформации опухолей: новые подходы к терапии глиом", представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.**

Для развития эффективной противоопухолевой терапии необходимы как прикладные, так и фундаментальные исследования. Совершенно очевидно, что создание эффективных противоопухолевых препаратов невозможно без четкого представления о механизмах иммунной и опухолевой защиты. Трудность разработки приемов противоопухолевой терапии состоит в том, что опухоли представляют собой сложную тканевую систему, постоянно меняющуюся во времени. Известно, что для выживания опухолевая клетка применяет стратегию, известную как иммуноускользание. К механизмам иммуноускользания относятся как сбрасывание с клеточной поверхности комплексов гистосовместимости (При этом клетка становится неузнаваемой классических цитотоксических лимфоцитов), так и блокировки цитотоксических путей, ведущих к гибели опухолевой клетки. Для борьбы с такими уклоняющимися клетками организм снабжен многогранными агентами и механизмами. Углубленное изучение таких механизмов сопровождается поиском соединений, способных активировать программируемую гибель таких клеток. Однако, трудность противоопухолевой терапии состоит в том, что у опухолевых клеток существует еще одна линия защиты. Клетки, погибающие по пути апоптоза, способны секретировать вещества, ускоряющие пролиферацию и миграцию выживших соседних клеток, что приводит к рецидиву заболевания. Диссертационная работа Павлюкова М.С. посвящена исследованию механизмов блокирования апоптоза и изучению роли апоптоза в эволюции злокачественных новообразований. Учитывая вышесказанное, ее актуальность не вызывает сомнений.

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов работы и их Обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 219 страницах, содержит 110 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 216 источников.

В обзоре литературы рассматриваются внутриклеточные механизмы программируемой клеточной смерти и роль апоптоза в межклеточной коммуникации. Отдельно приводится характеристика глиобластомы. Рассматриваемые вопросы полностью соответствуют теме диссертации. Литературный обзор написан ясно, логично, хорошим научным языком. Он может быть с небольшими изменениями отдельно опубликован.

В разделе "Материалы и методы" автор приводит описание самых разнообразных методов, включающих методы работы с ДНК, РНК, белками, бактериями, эукариотическими клетками, внеклеточными везикулами, тканями, животными и компьютерный анализ

данных. Широкий арсенал различных методических подходов характеризует Павлюкова М.С., как высококвалифицированного специалиста.

Глава "Результаты и Обсуждение" состоит из четырёх основных частей, логически связанных между собой. В первой части этого раздела исследованы молекулярные механизмы действия белков, принимающих участие в регуляции апоптоза: AIF, Сурвивина, Параоксаназы 2 и Трансглутамазы 2. Диссертантом впервые было установлено, что AIF связывается с Морталином, представителем семейства белков теплового шока, ассоциированным с внешней поверхностью наружной мембраны митохондрии. Далее было показано, что изменение конформации AIF при индукции апоптоза приводит к диссоциации AIF-морталин комплекса и потере связи этого белка с мембраной митохондрии. Предположение автора о том, что повышенное количество Морталина будет удерживать AIF на поверхности митохондрии и препятствовать развитию апоптоза не подтверждено экспериментально.

Функциональная активность антиапоптотического белка Сурвивина хорошо известна: он блокирует активатор каспазы 3 белок Smac/Diablo и связывается с антиапоптотическим белком XIAP, предотвращая его протеасомное расщепление. Результаты работы Павлюкова опровергают устоявшееся мнение о том, что регуляторное действие Сурвивина проявляется его димером. Диссертант приводит убедительные данные, свидетельствующие о том, что с тем и другим белком может связываться мономер Сурвивина. По-видимому, участок связывания с белками Smac/Diablo и XIAP соответствует участку димеризации. Использование РНК-интерференции и клеточных линий, экспрессирующих мутанты Сурвивина, позволяет считать, что мутант Сурвивина, не способный к димеризации, более эффективно ингибирует активность каспазы 3 при индукции апоптоза. Довольно низкие эффекты ингибирования можно объяснить низкой активацией белка Smac/Diablo при индукции апоптоза цисплатином.

Павлюковым М.С. также было установлено, что Параксоназа 2 защищает при апоптозе клеточные мембраны от окисления, способствуя выживанию солидных опухолей.

Разработав метод, позволяющий следить за активацией Трансглутамазы 2 в живой клетке, диссертант продемонстрировал на ранних стадиях апоптоза изменение конформации и активацию этого фермента, ингибирующего каспазу 3, повышая тем самым выживаемость опухолевых клеток.

Наибольший интерес вызывает глава, в которой исследуется роль апоптоза в эволюции злокачественных опухолей. На первом этапе исследований автором было установлено, что клетки аденокарциномы яичника, погибающие по пути апоптоза после сеанса химиотерапии, секретируют в асцитную жидкость белковые и РНК компоненты сплайсосом, заключенные в мембранные везикулы, и эти везикулы переносят сплайсосомы умирающих клеток в здоровые реципиентные клетки. Эти результаты были подтверждены на более сложной модели - раке головного мозга, глиобластоме. На следующем этапе диссертант выяснил механизмы экспорта сплайсосомы в цитоплазму. Использование флуоресцентно-меченых белков позволило продемонстрировать диссоциацию

сплайсосомного белка из комплекса с белком ядерного матрикса и выход в цитоплазму. Блокирование экспорта сплайсосомных белков в присутствии ингибитора каспаз широкого спектра действия zVAD(OMe)fmk позволяет предположить участие каспаз в этом процессе. Автор указывает, что при индукции апоптоза белок HNRNPU расщепляется каспазами и N-концевая часть этого белка остается в ядре, связанная с хроматином, а C-концевая часть этого белка покидает ядро в составе сплайсосомы. Однако, не ясно, о каких каспазах идет речь. Использование специфических каспазных ингибиторов позволило бы более детально представить роль каспаз в этом процессе.

Далее было установлено, что сплайсосомные белки, заключенные в апоптотические везикулы, изменяют сплайсинг пре-мРНК в реципиентных клетках и вызывает появление в этих клетках изоформ, характерных для мезенхимального фенотипа глиобластомы. С изменением фенотипа реципиентных клеток изменяется их функциональная активность: снижается выживаемость клеток, ускоряется рост опухолей, увеличивается миграция опухолевых клеток.

Очень интересны результаты, свидетельствующие о том, что белок RBM11, присутствующий в везикулах апоптотических клеток, ответственен за эффект этих везикул на реципиентные клетки глиобластомы. Показано, что этот белок может переноситься в ядра реципиентных клеток, не подвергаясь деградации. В зависимости от уровня белка RBM11 в клетках изменяется их фенотип. Повышенная экспрессия этого белка в пронейрональных клетках увеличивает уровень мезенхимальных маркеров. Напротив, понижение экспрессии RBM11 в клетках с мезенхимальным фенотипом приводит к увеличению пронейрональных маркеров и к активации клеточной гибели.

Таким образом, в диссертации четко охарактеризован один из путей перехода опухолевых клеток в более агрессивный мезенхимальный фенотип, индуцированный погибающими апоптотическими клетками.

В третьей части работы автором были созданы новые соединения, убивающие наиболее агрессивные популяции клеток глиобластомы. Полученные препараты предназначались для направленного действия на небольшую популяцию стволовых клеток глиобластомы. В ходе работы были получены ингибиторы трех белков, убивающие популяции стволовых и мезенхимальных клеток: LLP3, ингибитор регулятора апоптоза Сурвивина, СМР3а, ингибитор регулятора сплайсинга - киназы NEK2, GA11, ингибитор маркера стволовых клеток альдегиддегидрогеназы. Полученные препараты ингибировали стволовые клетки глиобластомы *in vitro*, увеличивали выживаемость животных и замедляли рост опухолей, трансплантированных иммунодефицитным мышам.

В последней четвертой части работы с использованием TOF-SIMS масс спектрометрии получены интересные результаты, позволяющие детектировать в опухолевой ткани одновременно белки и липиды.

В целом, диссертация Павлюкова М.С. производит очень хорошее впечатление. Описание результатов исследований и их обоснование характеризует автора как грамотного,

вдумчивого специалиста, способного к глубокому анализу полученных данных, а рассматриваемая диссертация является стройным исследованием, открывающим перспективы для дальнейших исследований, имеющих как фундаментальную, так и прикладную направленность.

Достоверность данных не вызывает сомнений, выводы соответствуют ее содержанию и логично вытекают из анализа собственных данных автора. Однако, их формулировка оставляет желать лучшего. Некоторые выводы очень кратки и малоинформативны, это затрудняет оценку полученных результатов. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в двадцати научных статьях, опубликованных в российских и зарубежных журналах. Следует заметить, что цитирование статей, опубликованных в российских журналах, на английском языке, неприятно удивляет.

Работа не лишена недостатков, но они относятся к форме изложения, а не к существу выводов, и не снижают ценность этой работы, которая вносит существенный вклад в понимание роли апоптоза как в гибели опухолевых клеток, так и в пролиферации более устойчивых агрессивных клеток.

Диссертация Павлюкова Марата Самвеловича "Роль апоптоза в трансформации опухолей: новые подходы к терапии глиом" является оригинальным, законченным и ценным научным трудом и соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а диссертант заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология".

Доктор биологических наук по специальности биохимия 03.01.03

профессор, главный научный сотрудник лаборатории

Молекулярной иммуногенетики рака

*Сащенко*

Сащенко Лидия Павловна

Института биологии гена Российской академии наук

Россия, 119334, Москва ул. Вавилова 34/5

Телефон: +7(495) 1359763

e-mail: [sashchenko@genebiology.ru](mailto:sashchenko@genebiology.ru)



Подпись руки доктора биологических наук, профессора Сащенко Л.П. заверяю

Учёный секретарь ИБГ РАН, д.б.н.

*Набирочкина*

Набирочкина Е.Н.