

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ларионовой Татьяны Дмитриевны на тему «Сравнительный анализ изоформ рибосомального белка RPL22L1 в регуляции фенотипа клеток глиобластомы», представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Современная наука достигла больших успехов в понимании природы многих заболеваний и разработке методов их лечения, однако проблема борьбы с раком остается по-прежнему злободневной. В то время как некоторые виды злокачественных опухолей уже успешно лечатся, глиобластома все еще остается крайне опасным заболеванием со 100%-ной гибелью пациентов, которая происходит в течение достаточно короткого времени после постановки диагноза. Внутриопухолевая клеточная гетерогенность глиобластом является одним из серьезных факторов, ограничивающих поиск действенной терапии. В связи с этим крайне важным направлением исследований является изучение механизмов, приводящих к появлению в пределах одного новообразования клеток с самыми разными молекулярно-биологическими свойствами. В работе Ларионовой Т. Д. устанавливается взаимосвязь между микроокружением опухолевых клеток и внутриклеточными процессами, формирующими фенотипическое разнообразие опухоли. Таким образом, не вызывает сомнения **актуальность** данного исследования, а полученные результаты вносят существенный вклад в наши познания о биологии развития глиобластом.

Научная новизна исследований и полученных результатов:

В работе Ларионовой Т.Д. было сделано сразу несколько интереснейших наблюдений, характеризующихся несомненной научной новизной. Было обнаружено, что рибосомы клеток глиобластомы, находящиеся в разных частях опухоли, отличаются по белковому составу и причина этих различий - альтернативный сплайсинг пре-мРНК рибосомальных белков. На настоящий момент работа Ларионовой Т. Д. является одной из немногих, в которых описывается роль альтернативного сплайсинга в появлении разных популяций рибосом. При анализе сплайсинга пре-мРНК рибосомальных белков оказалось, что транскрипт *RPL22L1* дает начало двум изоформам: RPL22L1a и RPL22L1b, причем о существовании последней ранее не было известно. Было установлено, что изоформы RPL22L1a и RPL22L1b обладают разными функциями: RPL22L1a входит в состав

рибосомы и участвует в регуляции трансляции, а RPL22L1b не является компонентом рибосомы, принимая участие в регуляции сплайсинга. В работе Ларионовой Т.Д. впервые показано, что RPL22L1b регулирует сплайсинг, способствуя деградации длинной некодирующей РНК MALAT1, что в итоге приводит к усилению стволовых свойств клеток. Эти данные иллюстрируют важные внерибосомные функции рибосомальных белков. Также было экспериментально подтверждено, что в ответ на закисление внеклеточного pH происходит изменение сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 в сторону образования RPL22L1b, которая позволяет клеткам пролиферировать в агрессивных внешних условиях. Это крайне важное наблюдение, так как оно описывает ранее неизвестный механизм адаптации опухолевых клеток к снижению внеклеточного pH. Также в работе была продемонстрирована положительная корреляция между появлением изоформы RPL22L1b и экспрессией фактора сплайсинга SRSF4. Существующие данные о роли этого фактора сплайсинга в онкогенезе мало изучены, и работа Ларионовой Т.Д. однозначно обогащает наши знания о функциях этого белка. Наконец, был обнаружен новый низкомолекулярный ингибитор киназ сплайсосомных белков, нарушающий сплайсинг пре-мРНК RPL22L1. В работе рассматривается возможный терапевтический потенциал данного соединения и его аналогов для применения в качестве противоопухолевой терапии.

Достоверность результатов и обоснованность выводов и рекомендаций

Проделан внушительный объем работы, причем на очень высоком методическом уровне. Надежность и достоверность полученных результатов обеспечивается квалифицированным использованием современных молекулярно-биологических и культуральных методов. Во всех проводимых экспериментах поставлены адекватные контроли, использовано достаточное количество повторов.

Выводы диссертации основаны на полученных результатах и логически вытекают из проведенных экспериментов.

Материалы исследования были представлены на двух Российских конференциях. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе и высокорейтинговых. Печатные работы и автореферат в полной мере отражают содержание диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация Ларионовой Т.Д. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и обсуждения,

Заключения, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 128 страницах, содержит 56 рисунков, 3 таблицы. Список цитируемой литературы включает 183 источника. Материал диссертации изложен логично, написан хорошим языком и легко читается.

Введение в полной мере обосновывает актуальность и значимость проводимого исследования, в нем сформулированы цель и решаемые задачи.

В **Обзоре литературы** приведено подробное описание современной классификации подтипов глиобластом и особенностей микроокружения опухолевых клеток. Выделены основные проблемы этой области. Отдельный раздел посвящен подробному описанию роли и механизмам регуляции альтернативного сплайсинга в онкогенезе. Также подробно рассмотрено современное состояние науки в вопросе влияния рибосом и рибосомальных белков на свойства нормальных и опухолевых клеток. Все три раздела имеют непосредственное отношение к теме и объектам исследования. Информация хорошо структурирована, что демонстрирует глубокое знание предмета диссертантом. Ознакомление с **Обзором литературы** хорошо подготавливает читателя к дальнейшему восприятию проведенных исследований.

В **Материалах и методах** подробно описаны все использованные автором методики. Стоит отметить внушительный объем освоенных автором методов, в числе которых микробиологические, молекулярно-биологические, генно-инженерные.

Результаты и обсуждение довольно обширны и разделены на пять подглав. Первые три подглавы посвящены изоформам рибосомального белка RPL22L1, их функциям, условиям появления и влиянию на свойства клеток глиобластомы. В этой части работы впервые описывается новая изоформа RPL22L1b, доказываются присутствие ее мРНК в разных типах клеток и тканей. Далее с помощью разнообразных подходов автор демонстрирует, что мРНК RPL22L1b подвергается трансляции с образованием белка. Ларионова Т.Д. подтвердила появление RPL22L1b, используя не только первичные культуры глиобластом, но и образцы опухолей пациентов, взятых из зон с заранее известным рН, что однозначно добавляет убедительности полученным результатам. Проведенные Ларионовой Т.Д. исследования достоверно описывают функции изоформ RPL22L1 и их различный вклад в формирование свойств опухолевых клеток. В работе продемонстрирована связь типа сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 и закисления внешней среды. В четвертом разделе подробно исследуется механизм регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК RPL22L1. Большое количество полученных Ларионовой Т.Д. данных

позволяет проследить последовательность событий, лежащих в основе экспрессии каждой из изоформ RPL22L1. Исследования, описанные в пятой подглаве, сосредоточены на низкомолекулярном ингибиторе киназ сплайсосомных белков, соединении Fg1059, которое может нарушать сплайсинг пре-мРНК RPL22L1 за счет изменения фосфорилирования фактора сплайсина SRSF4. Отдельно стоит отметить, что автор показала возможность применения Fg1059 или его аналогов в комбинации со стандартными противоопухолевыми препаратами, что потенциально может быть использовано при поиске новых терапевтических агентов.

В **Заключении** автором кратко суммируются полученные результаты.

Выводы, сделанные из проведенной работы, полностью отражают суть полученных результатов.

Замечания

В ходе ознакомления с диссертацией Ларионовой Т.Д. у меня возникли некоторые вопросы и замечания:

1. Известно, что закисление внеклеточного pH отрицательно влияет на пролиферацию клеток. Это, в свою очередь, может приводить к уменьшению в клетках количества рибосом. Поэтому данные масс-спектрометрии, изображенные на рис. 25Б, могут свидетельствовать не о разнице в количествах белках рибосомы, а о разнице в количествах самих рибосом. В связи с этим хотелось бы получить больше информации по поводу нормирования данных, представленных на рис. 25Б.

2. Все эксперименты в данной работе построены на оверэкспрессии изоформ RPL22L1 в клетках. Однако напрашивается вопрос: что будет с клетками, если провести нокдаун одной и второй изоформы? Будут ли клетки жизнеспособны? Проводились ли в рамках данной работы такие эксперименты?

3. В тексте встречается некорректное использование некоторых терминов. Например, на рис. 27А представлены результаты электрофореза кДНК. Однако подпись к рисунку утверждает, что изображено «соотношение изоформ RPL22L1». В этом случае правильнее была бы подпись «соотношение мРНК изоформ RPL22L1», так как термин «изоформа» все же подразумевает белок.

4. На рис. 28Д стоило бы отметить пик, соответствующий уникальному пептиду изоформы RPL22L1b.

5. В Списке использованной литературы под номером 88 находится лишний источник.

6. Хотя работа в целом выполнена на очень высоком уровне, в тексте встречаются многочисленные опечатки и стилистические ошибки.

Тем не менее, указанные вопросы и недостатки не снижают ценность диссертационной работы и производимого ею благоприятного впечатления.

Заключение

На основании анализа текста диссертации и автореферата можно заключить, что диссертационная работа Ларионовой Татьяны Дмитриевны **«Сравнительный анализ изоформ рибосомального белка RPL22L1 в регуляции фенотипа клеток глиобластомы»** является самостоятельным законченным исследованием и полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент

зав. кафедрой общей патологии
ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ»
д.м.н., профессор,
член-корреспондент Академии наук
Республики Татарстан



Бойчук Сергей Васильевич

« 18 » января 2023 г.

Контактные данные:

Телефон: (843) 236-06-58
Email: boichuksergei@mail.ru
Адрес: 420012, Республика Татарстан
г.Казань, ул.Бутлерова, д.49



Подпись Бойчука Сергея Васильевича заверяю

Ученый секретарь
ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ»
доктор медицинских наук, профессор



Мустафин Ильшат Ганиевич