

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России)

FEDERAL STATE BUDGETARY SCIENTIFIC INSTITUTION
«N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center»
of the Ministry of Health of the Russian Federation
(«N.N. Blokhin RCRC»)

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24
Тел. +7 (499) 324-11-14, +7(499) 324-11-24, факс +7(499) 323-57-77
ОКПО 01897624, ОГРН 1037739447525, ИНН/КПП 7724075162/772401001
e-mail: ronc@list.ru, http://www.ronc.ru

115478 Kashirskoe shosse, 24, Moscow, Russia
Phone: +7 (499) 324 1114, +7 (499) 324 1124, fax: +7 (499) 323 5777
e-mail: ronc@list.ru, http://www.ronc.ru

№ 01-13/426
« 03 » 03 20 17 г



Утверждаю

Директор ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России

академик М.И. Давыдов

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

на диссертационную работу

Дакс Александры Александровны

«ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УБИКВИТИНЛИГАЗЫ
PIRH2 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА»,

представленную к защите на соискание учёной степени кандидата
биологических наук (специальность 03.01.03 – Молекулярная биология)

Актуальность исследования

Белок Pirh2 относится к семейству RING-домен-содержащих E3-убиквитинлигаз, обеспечивающих деградацию более чем 80% белков клетки. Повышенная экспрессия Pirh2 была показана в опухолях различного гистологического типа и локализаций, что свидетельствует об участии Pirh2 в канцерогенезе. Наблюдается корреляция уровня экспрессии Pirh2 с ускоренным

ангиогенезом в опухоли, повышением количества опухолевых узлов и снижением продолжительности жизни пациентов. Одной из важнейших известных функций этого белка является убиквитин-зависимая протеасомная деградация главного онкосупрессора клетки – p53. Убиквитинлигаза Pirh2 способна модифицировать активированную форму p53 и, таким образом, снижать его концентрацию в клетке, подавляя экспрессию регулируемых p53 белков, ответственных за остановку клеточного цикла и апоптоз. Однако помимо p53 мишенями Pirh2 являются и другие белки, участвующие в регуляции клеточного цикла, запуске апоптоза, продвижении клетки по клеточному циклу и ответе на повреждение ДНК. Роль белка Pirh2 в данных процессах остается недостаточно изученной. Для понимания процессов регуляции экспрессии этого белка, определения спектра белков, с которыми Pirh2 взаимодействует, и оценки его туморогенного потенциала требуется проведение специального исследования. Таким образом, изучение функциональных характеристик убиквитиназы Pirh2 является актуальным исследованием в области молекулярной биологии и экспериментальной онкологии.

Новизна диссертационного исследования

В диссертационном исследовании А.А. Дакс выявлено более 200 неизвестных ранее белков-интерактантов Pirh2, впервые продемонстрировано функциональное взаимодействие ряда белков с Pirh2. Представленные данные открывают новые направления исследования функционирования убиквитинлигазы Pirh2. В работе впервые продемонстрирована регуляция убиквитинлигазы Pirh2 отличными от p53 белками данного семейства. Полученные данные чрезвычайно интересны, так как дополняют существующую картину p53-ассоциированных сигнальных путей. Наконец, в работе показано положительное влияние изучаемого белка на туморогенный потенциал клеток, что расширяет современные научные представления о механизмах опухолевой трансформации клеток.

Научно-практическая значимость данной работы, в первую очередь, связана с детализацией понимания функционирования убиквитинлигазы Pirh2, осуществляющей как онкогенные, так и онкосупрессорные функции, в зависимости от особенностей клеточного контекста. В данной работе была продемонстрирована туморогенная роль белка Pirh2 в клетках H1299, что позволяет рассматривать изучаемый белок как потенциальную мишень для разработки

таргетной терапии опухолей легкого с негативным статусом p53. Благодаря полученным результатам по детализации спектра белков, с которыми Pirh2 взаимодействует, определению функциональных связи Pirh2 с гистонами H2AZ и Elavl/HuR автором данного исследования открыты новые направления исследований Pirh2-зависимой регуляции таких процессов как опухолевая трансформация клеток, клеточного цикла и активации апоптоза.

Общая характеристика работы

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 148 страницах машинописного текста, состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 264 наименования. Материалы диссертации иллюстрированы 35 рисунками и 4 таблицами.

Во «Введении» к работе поясняется актуальность выбранной темы, а также раскрывается цель и задачи исследования. Далее в этом разделе кратко описываются результаты работы и основные положения, выносимые на защиту, обсуждается научная новизна полученных результатов и их теоретическое и практическое значение, приведен список опубликованных по теме диссертации печатных работ и перечень конференций, на которых результаты исследования А.А.Дакс были апробированы.

Обзор литературы состоит из нескольких глав и описывает текущее представление о механизмах убиквитин-протеасомной деградации белков, ее месте в регуляции клеточного цикла, а затем обобщает современные данные о структуре и функциях убиквитинлигазы Pirh2. Автор логично завершает данный раздел анализом опубликованных данных по участию Pirh2 в канцерогенезе, раскрывая прикладное значение своего исследования.

В разделе «Материалы и методы» приводится детальное описание использованных в исследовании клеточных линии, условий культивирования клеток, широкого ряда современных молекулярно-биологических подходов, приведены описание генетических конструкций, последовательности олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для проведения ПЦР и для получения лентивирусных конструкций с малыми шпилечными РНК. Также в этом разделе описаны методы проведения электрофореза, иммуноблоттинга, протеомного анализа

с использованием аффинной адсорбции в сочетании с жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией. Все использованные в работе методы адекватны поставленным задачам.

В разделе «Результаты» представлено подробное описание выполненных экспериментов и представлены полученные результаты. В качестве наиболее значимых полученных результатов следует отметить: определение нового механизма регуляции экспрессии гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2, выявление спектра новых белков, с которыми взаимодействует данная убиквитинлигаза. Особо интересным результатом являются данные о функциональном взаимодействии Pirh2 с каноническими и неканоническими гистонами. Важными результатами исследования являются данные по влиянию белка Pirh2 на онкогенный потенциал клеток карциномы легкого.

В разделе «Обсуждение» представлено обобщение полученных результатов, их сопоставление с имеющимися литературными данными, анализ их новизны и перспектив прикладного использования. Данный раздел характеризует А.А. Дакс как вполне сложившегося ученого, способного к критическому и вдумчивому анализу проделанной работы.

Однако диссертационное исследование А.А. Дакс не лишено замечаний.

Прежде всего, несмотря на очень аккуратное оформление диссертационной работы, четкое изложение материала, в тексте встречаются англицизмы, которые имеют русские устоявшиеся обозначения. Например, термин “scrambled shRNA” уместно было бы заменить на «неспецифические малые шпилечные РНК». В таблице 2 названия белков приведены на английском языке.

В разделе «Материалы и методы» было бы уместно приведение карт, использованных в работе плазмид. В приведенных данных по спектру белков, с которыми выявлено взаимодействие Pirh2, отсутствует обоснование выбора критического показателя значимости взаимодействия.

Представляется целесообразным обоснование использования тех или иных клеточных линий, выбранных автором для экспериментов на разных этапах работы. Так, почему автор выбрал линию HCT116 для анализа активации Pirh2 транскрипционным фактором p53, почему для исследования активации экспрессии данной убиквитинлигазы транскрипционным фактором p63 была выбрана линия

Saos2, а для анализа интерактома HEK293-T не поясняется.

В разделе работы по изучению функциональных взаимодействий Pirh2 с белками Ku70, Elav11 и гистона H2A.Z хотелось бы иметь более развернутое обоснование выбора именно этих белков.

Высказанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы.

Все **результаты**, изложенные в диссертации, получены с использованием адекватных экспериментальных методов исследования, что обеспечивает их **достоверность**. **Выводы диссертации обоснованы** и полностью отражают полученные результаты.

По результатам данной диссертации опубликованы 15 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых международных и отечественных научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ, а также 11 тезисов докладов на международных и отечественных конференциях.

Материалы диссертации были представлены на трех международных конференциях «FEBS» (Париж, 2014), «Advances in Oncology» (Афины, 2015) и «12th International Congress of Cell Biology» (Прага, 2016), а также на четырех отечественных конференциях: «IV Конференции молодых ученых ИНЦ РАН» (СПб, 2014), XVII Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (СПб, 2014), Онкологическом форуме «Петровские чтения» (СПб, 2015), «V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии» (СПб, 2016).

Заключение

В целом диссертация А.А. Дакс, выполненная на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки; в ходе её выполнения был получен ряд приоритетных данных по актуальной проблеме молекулярной биологии. Диссертационная работа Александры Александровны Дакс «Функциональная характеристика убиквитинлигазы Pirh2 в опухолевых клетках человека», выполненная под руководством д.б.н. Николая Анатольевича Барлева, представляет собой законченное исследование, является научной квалификационной работой, содержащей новые данные о механизмах регуляции экспрессии Pirh2, белок-белковых взаимодействиях данной убиквитинлигазы а также влиянии Pirh2 на туморогенный потенциал клеток немелкоклеточной карциномы легкого H1299.

Диссертация соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв рассмотрен и утверждён на заседании Ученого совета НИИ канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от 21 февраля 2017 г.)

Заведующий отделом химического канцерогенеза
НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России
доктор медицинских наук
по специальности 14.01.12 – онкология
Марианна Геннадиевна Якубовская

Адрес: 115478, г. Москва, Каширское шоссе 24
Тел: +7(499)3235822
E-mail: mgyakubovskaya@mail.ru
Сайт научного центра: <http://www.ronc.ru/>

Зам. директора ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России
Директор НИИ канцерогенеза
доктор биологических наук
по специальности 14.01.12 – онкология
Красильников Михаил Александрович

Адрес: 115478, г. Москва, Каширское шоссе 24
Тел: +7(499)3235822
E-mail: mgyakubovskaya@mail.ru
Сайт научного центра: <http://www.ronc.ru/>

Учёный секретарь
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России
кандидат медицинских наук
по специальности 14.00.12 - Онкология



Кубасова И.Ю.