

ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертационной работе

Шувалова Олега Юрьевича

на тему

«ЛИЗИН СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, MDM2 И SET7/9, В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТРЕСС»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

03.01.03 – молекулярная биология.

Диссертационная работа Шувалова Олега Юрьевича посвящена исследованию функциональной роли белков MDM2 и SET7/9, вовлечённых в регуляцию онкогенеза и клеточного ответа на генотоксический и метаболический стресс. Несмотря на активные исследования, в этой области знаний остаётся множество белых пятен. Одно из таких пятен поможет закрыть представленная диссертация.

Актуальность работы.

Актуальность исследования функциональной роли ключевых регуляторов онкогенеза не требует дополнительных комментариев. В работе показано, что белки MDM2 и SET7/9 вовлечены в контроль одноуглеродного метаболизма, исследовано их взаимодействие и выявлены белки, связывающиеся с MDM2 и SET7/9. Все эти данные особенно актуальны с учётом того, что исследуемые белки контролируют продукцию p53 и вовлечены в другие пути регуляции онкогенеза.

Научная новизна.

В работе впервые показано существование в клетках петли отрицательной обратной связи метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2 и идентифицирован целый ряд белков, взаимодействующих с MDM2 и SET7/9. Показана потенциальная вовлечённость SET7/9 и MDM2 в контроль одноуглеродного метаболизма. Все эти данные являются новыми и опубликованы автором в рейтинговых российских и международных журналах.

Научно-практическая значимость диссертационной работы.

Несмотря на то, что исследование носит фундаментальный характер и не направлено непосредственно на разработку лекарственных средств, можно отметить, что некоторые данные об онкогенных свойствах MDM2 могут быть в перспективе учтены при разработке методов терапии канцерогенеза.

Апробация результатов.

Материалы диссертации были представлены на двух международных и двух российских конференциях. Результаты, полученные автором, опубликованы в 4-х статьях в журналах, рекомендуемых ВАК. Особенно приятно отметить, что автор диссертации является первым автором статьи в журнале «Current gene therapy», который имеет импакт-фактор выше 2,5.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Шувалова Олега Юрьевича написана по общепринятому плану и включает в себя стандартные разделы. Диссертация изложена на 128 страницах. «Список литературы» включает 164 наименования.

Обращает на себя внимание хорошая логика изложения материала. Хотелось бы отметить такое достоинство работы, как краткость изложения, что подчёркивает умение автора чётко формулировать мысли.

По смысловой части «Введения» и «Обзора литературы» замечаний почти нет, поэтому я сосредоточусь в основном на стиле и форме изложения материала. Из системных ошибок я заметил, что автор последовательно и многократно пишет слово «тоже» отдельно, даже в тех случаях, когда оно является союзом и должно быть написано слитно. Непонятно, почему первый подраздел первой главы обозначен номером 2.1? Такую же нумерацию имеет первый подраздел следующей главы.

На странице 21 автор пишет:

«Независимо от выбора промотора (P1 или P2) трансляция полноразмерной изоформы (p90) инициируется со старт-кодона третьего экзона».

Эта фраза означает, что первый и второй экзон не транслируются. Экзон по определению кодирует аминокислотную последовательность. Конечно, надо учитывать возможность альтернативного сплайсинга, но последовательности, которые никогда и нигде не кодируют аминокислотные последовательности, экзонами называться не могут. Вероятно, речь идёт о 5'-нетранслируемой последовательности гена.

На странице 23 используется неудачное сочетание предложений:

«У мышей, сверхэкспрессирующих MDM2, вне зависимости от статуса p53, до 4 раз была повышена доля образуемых сарком. Таким образом, при сверхэкспрессии MDM2 у p53-мышей снижалась доля лимфом, и в несколько повышался процент сарком».

Второе предложение явно не следует из первого, и оборот «таким образом» лишний.

На странице 35 приведена аббревиатура «SAM» без расшифровки. Не уверен, что все должны знать это обозначение. В качестве придирки отмечу, что словосочетание «деятельность ферментов» (стр. 39) не кажется удачным. Можно говорить о деятельности какой-либо очень важной персоны, а ферменты, как и учёные, обычно просто работают, или проявляют активность.

Начиная со стр. 42 и далее автор везде называет «микроЭррей» «микроАрреями». Я понимаю, что это в любом случае англицизм, но всё же общепринятое написание в русском-биологическом языке предполагает использование буквы "Э". Лучше, по моему мнению, использовать термин «микрочипы».

В целом, «Обзор литературы» производит самое благоприятное впечатление. На основании приведённых данных и их интерпретации читателю легче воспринимать логику работы и полученные автором результаты.

В разделе «Материалы и методы» на странице 45 и далее приводится обозначение «shРНК». В списке сокращений его нет, а расшифровка (шпилечная РНК) представлена почему-то только на 61-й странице. Слово «конфлюэнтность» на той же странице и в последующем тексте написано с двумя ошибками - «конфлУЕнтность». Ещё раз отмечу, что даже при использовании заимствованных слов надо соблюдать правила.

Возникает вопрос к описанию методики «Выделение РНК и синтез кДНК». На странице 48 приведено следующее описание последовательности работы после выделения РНК тризольным методом:

«Перед синтезом кДНК проводили обработку РНК ДНКазой (ThermoFischerScientific, USA) в соответствии с инструкцией производителя с последующим фенольным переосаждением РНК, согласно стандартной методике (Манниатис, 1980)».

Непонятно, зачем переосаждать РНК фенолом, когда стандартно после обработки ДНК-азой обычно используют тепловую инактивацию этого фермента, а затем ведут синтез кДНК? Кроме того, фамилия Маниатис пишется с одной буквой «н».

Подраздел 2.8. «Экспрессия и очистка рекомбинантных белков» начинается с неудачного предложения:

«Вектора, кодирующие GST-варианты MDM2 и SET7/9, а так же нативный GST (контроль) были экспрессированы в бактериальных системах на основе *E. coli*, продуцирующих штаммах BL21(de3)pLysSGold и BL21(de3)pLysSRosetta. Данные штаммы были трансформированы указанными векторами, после чего.... и т.д.»

Разобраться в этом предложении можно, но зачем о простых вещах говорить так сложно? Достаточно было бы сказать:

«Штаммы *E. coli* (перечислить их) были трансформированы векторами, кодирующими гены такие-то...».

При описании метода 2.12 «Убиквитинилирование *in vivo*» возникли проблемы с нумерацией подразделов.

Подраздел 2.14 «Иммуноблоттинг» начинается со слов:

«С целью вестерн-блоттинга....».

Должен отметить, что «Вестер-блоттинг» был не целью, а средством для достижения цели.

Иногда при изложении методов автору изменяет чёткость формулировок. Например, остаётся только догадываться о смысле фразы «мы ... комбинировали культуральную среду, содержащую мёртвые открепившиеся клетки, с трипсинизированными прикрепленными клетками». Наверное, имеется в виду, что в анализ брали как выжившие, так и мёртвые, открепившиеся клетки?

К разделу «Результаты» есть некоторые вопросы и замечания. В частности, в подразделе 3.1.1 «Нокдаун SET7/9 повышает экспрессию MDM2 при генотоксическом стрессе» сравнивается содержание белка MDM2 в клетках с нокдауном гена SET7/9 и без (Рис. 10Б). Хотелось бы уточнить - выводы были сделаны на основании одной или нескольких повторностей Вестерн-блоттинга? Я не нашёл этой информации в работе. На рисунке 10Б видно, что наибольший уровень продукции MDM2 в клетках U2OS(SET7/9НД) наблюдается через 8 часов после обработки доксорубицином, а через 24 часа уровень MDM2 снижается. При анализе экспрессии этого же гена наблюдается совсем иная динамика. Чем можно объяснить этот результат, и воспроизводился ли он?

На странице 67 приведена следующая фраза:

«Полный список идентифицированных белков приведен в Табл. 6. Числовые значения в таблице (score) обозначают количество пептидов, идентифицированных для каждого конкретного белка».

Применительно к масс-спектрометрии параметр «Score» т.е. «Счёт масс-спектрометрии» не ограничивается количеством идентифицированных пептидов, а определяется рядом других показателей. Странно, что автор обозначает термином «Score» количество идентифицированных пептидов в таблице 6.

Не хотелось бы повторяться, но на странице 92 вновь абзац начинается со слов «С целью иммуноблоттинга с антителами ...». Вновь путаются понятия «цель» и «средство».

Вынужден отметить, что сигнал на рисунке 23А выглядит не эстетично, и это может создать сложности при публикации результатов в реферируемом журнале.

На странице 95 Олег Юрьевич пишет, что «Как видно из Рис. 25, экспрессия MTHFD2 и SHMT2 несколько повышена в U2OSHDSET7/9 клетках, что, в целом, соответствует результатам ПЦР в РВ».

Должен отметить, что на рисунке 25Г я не вижу изменения уровня продукции белка MTHFD2. Качество рисунка не позволяет однозначно трактовать результат. Кроме того, вновь возникает вопрос о том, сколько раз были воспроизведены результаты Вестерн-блоттинга?

В разделе «Обсуждение результатов» автор со знанием дела, детально и критично обсуждает собственные результаты, используя литературные источники. На основании полученных результатов Олег Юрьевич делает пять корректных выводов.

«Список литературы» оформлен в целом аккуратно. В редких случаях (как например, статьи № 25 и 58) не указаны последние страницы публикаций, или не хватает двойной косой черты после названия статьи.

Заключение

Диссертационная работа Шувалова Олега Юрьевича «Лизин специфические ферменты, MDM2 и SET7/9, в регуляции клеточного ответа на генотоксический и метаболический стресс», представленная на соискание ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология», является самостоятельным и законченным научным исследованием, которое вносит существенный вклад в изучение функциональной роли белков MDM2 и SET7/9. Сделанные замечания и перечисленные вопросы ни в коей мере не ставят под сомнение научную ценность проведённого исследования. По актуальности темы, научному и методическому уровню, качеству полученных данных, объёму проделанной работы, научной новизне и практической значимости диссертация Шувалова Олега Юрьевича полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Согласен на включение моих персональных данных в аттестационное дело, размещение в интернете и их дальнейшую обработку.

Заместитель директора по научной работе,
заведующий лабораторией генетического
моделирования болезней человека
Санкт-Петербургского филиала Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики имени Н.И. Вавилова
Российской Академии Наук,
Университетская наб., 7/9,
Санкт-Петербург, 199034
Тел.: +7-921-773-01-99
E-mail: apgalkin@mail.ru

доктор биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика
Галкин Алексей Петрович,
20.05.2016

Подпись *Галкин*
Удостоверяю *Г*

