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

№ 01-13/1385
«09» 06 2016 г

Утверждаю
Директор ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России
академик М.И. Давыдов

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ
на диссертационную работу
Шувалова Олега Юрьевича
«ЛИЗИН СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, MDM2 И SET7/9, В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА НА ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТРЕСС»,
представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук (специальность 03.01.03 – Молекулярная биология)

Актуальность исследования

Основным патогенетическим звеном онкологических заболеваний являются нарушения в генах, контролирующих процессы дифференцировки, пролиферации,

апоптоза, репарации ДНК и др. Одними из наиболее часто наблюдаемых генетических нарушений при различных формах онкологических заболеваний являются мутации гена-супрессора опухолевого роста p53, которые приводят к изменению его функциональной активности. Диссертационная работа О.Ю. Шувалова направлена на изучение ключевых регуляторов активности гена p53 – E3 убиквитин-лигазы MDM2 и лизиновой метилтрансферазы Set7/9. Помимо регуляции p53, в процессе канцерогенеза эти лизин-специфические ферменты выполняют и другие функции, что обуславливает целесообразность изучения p53-независимых свойств MDM2 и Set7/9. Таким образом, диссертационная работа О.Ю. Шувалова, как расширяющая наши представления о молекулярных механизмах канцерогенеза, так и являющаяся обоснованием для разработки новых подходов в комбинированной противоопухолевой терапии, безусловно, является актуальным исследованием в области молекулярной биологии и экспериментальной онкологии.

Новизна диссертационного исследования

В диссертационной работе О.Ю. Шувалова были получены приоритетные данные, свидетельствующие о ряде новых, p53-независимых механизмах участия MDM2 и Set7/9 в различных клеточных процессах. В частности, было показано существование в клетках механизма отрицательной обратной связи метилтрансферазы SET7/9 и E3 убиквитин-лигазы MDM2. Было также продемонстрировано, что экспрессия основных сплайс-изоформ MDM2, в отличие от полноразмерного белка, не влияет на устойчивость раковых клеток к важнейшим химиотерапевтическим препаратам – доксорубицину, цисплатину и метатрексату. Кроме того, были описаны новые взаимодействия целого ряда белков с метилтрансферазой SET7/9 и различными изоформами E3 убиквитин-лигазы MDM2. Эти выявленные белки эфферентных путей сигналинга участвуют в регуляции транскрипции, трансляции, процессинге РНК, метаболизме, образовании межклеточных контактов, что указывает на их важную роль в процессе канцерогенеза. Впервые было обнаружено участие SET7/9 и MDM2 в контроле одноуглеродного метаболизма за счёт влияния на экспрессию ферментов SHMT2 и MTHFD2, которые являются ключевыми игроками цикла превращений фолата. Было так же показано, что MDM2 является E3 убиквитин-лигазой для

серингидроксиметилтрансферазы SHMT2 и приводит к её убиквитинилированию с последующей протеасомной деградацией.

Теоретическая и практическая значимость данной работы состоит в определении структурно-функциональной особенностей изоформ MDM2 и SET7/9 и роли каждого конкретного, описанного в данной работе, взаимодействия MDM2 и SET7/9 с компонентами эфферентных путей передачи сигнала, что представляет значительный интерес для понимания их роли в процессах трансформации клетки и опухолевой прогрессии. Кроме того, данные о MDM2-опосредованной негативной регуляции SHMT2 актуальны в практическом плане в контексте разработки и применения ингибиторов MDM2 в комбинированной химиотерапии злокачественных новообразований.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 129 страницах машинописного текста, состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 169 наименования. Материалы диссертации иллюстрированы 31 рисунком и 16 таблицами.

Во введении работы автор обосновал актуальность исследования, сформулировал цели и задачи исследования, привел данные по научной новизне исследования, его теоретической и практической значимости, а также указал сведения по апробации результатов исследования.

В обзоре литературы приведены современные данные об известных молекулярных механизмах влияния MDM2 и Set7/9 на различные клеточные процессы. Автором подробно рассмотрены молекулярные пути одноуглеродного метаболизма. Описаны молекулярные механизмы ответа клеток на генотоксический и метаболический стрессы. Представленный обзор литературы свидетельствует о высокой эрудиции автора в области исследования, является хорошим обоснованием выбора методических подходов при решении поставленных в исследовании задач.

В разделе «Методы и методология исследования» О.Ю. Шувалов приводит подробное описание используемых в работе линий опухолевых клеток, методы получения трансгенных линий клеток и генетических конструкций, а также приведены протоколы используемых современных молекулярно-биологических

методик, в частности, ПЦР в реальном времени, электрофореза белков, иммуноблотинга, протеомного анализа с использованием GST pull-down в сочетании с жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией и других. Использование выбранных автором методик адекватно поставленным задачам.

В разделе «Результаты исследования» автор излагает особенности проведения экспериментов и подробно приводит полученные в исследовании результаты. В качестве основных результатов исследования можно отметить следующие: продемонстрирована взаимозависимостьуровней экспрессии и функциональной активности ферментов MDM2 и SET7/9 по механизму «петли обратной связи»; продемонстрирована роль различных изоформ MDM2 в ответе на генотоксическое повреждение; определены непосредственные эфферентные звенья MDM2 и SET7/9 сигналинга, проведена оценка влияния изоформ MDM2 и SET7/9 на факторы одноуглеродного метаболизма; показана влияние изоформ MDM2 и SET7/9 на уровень чувствительности опухолевых клеток к генотоксическим эффектам ряда противоопухолевых препаратов.

В разделе «Обсуждение результатов» автор сопоставляет полученные им данные с опубликованными данными в области исследования, что свидетельствует как о глубоком понимании автором предмета исследования, так и его хороших способностях к аналитическому мышлению. При этом особое внимание автор уделяет анализу полученных им данных по влиянию MDM2 на чувствительность к генотоксическому повреждению, что несомненно, имеет важное практическое значение для оптимизации протоколов химиотерапевтического лечения при использовании доксорубицина, цисплатины и других генотоксических агентов.

В «Заключении» диссертационной работы приведен обобщенный итог исследования и представлены выводы по выявленным закономерностям. Выводы исследования полностью соответствуют полученным автором результатам.

Однако, диссертационное исследование О.Ю.Шувалова не лишено замечаний. Прежде всего, это касается оформления работы. В оглавлении допущен сбой в нумерации подразделов, параграфы как Главы I, так и Главы II начинаются с цифры «2»; ряд иллюстраций приведены с использованием терминов на английском языке; в работе не указано, в какой форме приведены доверительные интервалы ($M \pm m$ или $M \pm \sigma$) и не указано, какие методы математической статистики были использованы; рисунок 6 приведен с низким уровнем разрешения; при оформлении списка

использованной литературы встречаются некоторые отклонения от ГОСТ 7.0.11-2011.

В разделе «Материалы и методы» в параграфе «масс-спектрометрия» идет описание не только масс-спектрометрии, но и предшествовавшей ей жидкостной хроматографии. Поэтому данный параграф стоило бы назвать «Жидкостная хроматография и масс-спектрометрия». Кроме того, в разделе «Материалы и методы» не указаны последовательности праймеров, использованных для создания векторов, кодирующих отдельные домены лизин-специфичной метилтрансферазы Set7/9.

Есть замечание по используемой автором терминологии. Так, вместо термина «оверэкспрессия» следует использовать «гиперэкспресия», термин «раковые клетки» следовало бы заменить на «опухолевые», так как автор работает с клетками не только эпителиального происхождения, но и соединительно-тканными, вместо «онкогенез» следует использовать «канцерогенез». Кроме того, в работе достаточно много англицизмов, которые имеют адекватный перевод на русский язык.

Высказанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы. Все полученные **результаты**, изложенные в диссертации, **достоверны,** они основаны на надёжности и адекватности применённых экспериментальных методик. В**ыводы диссертации обоснованы** и полностью отражают полученные результаты. Автореферат диссертации полностью раскрывает содержание исследования.

По результатам данной диссертации опубликованы 1 2 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых международных и отечественных научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ, а так же 8 тезисов докладов на международных и отечественных конференциях.

Материалы диссертации были представлены на Международных конференциях “FEBS 2014” (Париж, Франция) и “Advances in oncology 2015” (Афины, Греция), а так же на конференции молодых ученых Института цитологии РАН по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2014) и международной школе молодых учёных по молекулярной генетике (Москва, Звенигород, 2015).

Заключение

В целом диссертация О.Ю. Шувалова, 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 Шувалова Олега Юрьевича «Лизин специфические ферменты, MDM2 и SET7/9, в регуляции клеточного ответа на генотоксический и метаболический стресс», выполненная под руководством д.б.н. Николая Анатольевича Барлева, представляет собой законченное исследование, является научной квалификационной работой, содержащей новые данные о функционировании MDM2 и SET7/9 в клеточном ответе на генотоксический и метаболический стресс. Диссертация соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, 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 им. Н. Н. Блохина» Минздрава России Минздрава России (протокол № 6 от 7 июня 2016 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)3231419
E-mail: krasilnikovm@mail.ru
Сайт научного центра: http://www.ronc.ru/

Учёный секретарь НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
кандидат медицинских наук по специальности 14.00.12 – онкология
Кубасова Ирина Юрьевна