

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Гончарова Николая Владимировича на тему: «Тест-система для идентификации хромосомной нестабильности и новые молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность диссертационной работы

Актуальность, современность и своевременность представленного на отзыв диссертационного исследования определяется несколькими факторами. Во-первых, явление хромосомной, а в более широком смысле и геномной нестабильности, становится предметом активных исследований в качестве пускового патогенетического механизма развития наследственных, многофакторных и онкологических заболеваний человека. Работы в данной области до недавнего времени, действительно, были сфокусированы главным образом на анализе геномной нестабильности при онкологической патологии. Так, например, успехи в данном направлении позволили описать феномен микросателлитной нестабильности, идентифицировать драйверные мутации в генах мис-матч репарации ДНК и других репарационных и сигнальных систем в клетке, разработать информативные диагностические системы для выявления герминативных и соматических мутаций при наследственных формах колоректального рака, синдроме Ли Фраумени и ряде других форм онкологической патологии. Все это позволило предложить, в конечном итоге, эффективные методы профилактики наследственных форм злокачественных новообразований через технологии ЭКО и преимплантационного генетического тестирования. Что касается наследственных заболеваний, открытие феномена нестабильности тандемных повторов ДНК позволило описать новый класс болезней, связанных с динамическими мутациями. Однако, если говорить о геномной нестабильности на хромосомном уровне организации наследственной информации, то наши знания по-прежнему остаются ограниченными сравнительно небольшим числом синдромов, при которых в кариотипе пациентов выявляются множественные хромосомные аберрации, от

числовых нарушений до структурных аномалий хромосом – например, синдромы мозаичной анеуплоидии (OMIM 257300, OMIM 614114, OMIM 617598), синдром Блума (OMIM 210900), синдром Секеля (OMIM 210600), синдром Ниймегена (OMIM 251262), синдромы ICF, типы 1-4 (OMIM 242860, 614069, 616910, 616911).

Вместе с тем в последние годы с развитием вспомогательных репродуктивных технологий и методов преимплантационного генетического тестирования накапливается существенный пласт информации о высоком уровне хромосомной нестабильности и на самых начальных стадиях индивидуального развития организма. Появляющиеся в современной научной литературе сообщения о рождении здоровых детей с нормальным кариотипом после переноса мозаичных анеуплоидных эмбрионов в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения неожиданным образом свидетельствуют об активных процессах индукции и самокоррекции хромосомной нестабильности в раннем эмбриональном развитии человека (Greco et al., 2015; Spinella et al., 2018; Cram et al., 2019). Поиск молекулярных детерминант и пусковых механизмов данного биологического феномена представляет очевидную научную задачу в самом ближайшем обозримом будущем. Совершенно не исключено, что основные закономерности генерации и развития хромосомной нестабильности могут носить универсальный характер и быть справедливы как для процессов раннего онтогенеза, так и для онкогенеза. В этой связи, представленное диссертационное исследование, фактически, опережает возникающие задачи, предлагая новый инструмент для их решения.

Второй аспект актуальности и новизны диссертационной работы, несомненно, связан с развитием и разработкой технологий геномного редактирования на хромосомном уровне. Несмотря на активное и успешное развитие методов геномного редактирования, и прежде всего на основе системы CRISPR/Cas9, генно-инженерные манипуляции с наследственным материалом на уровне отдельных хромосом остаются чрезвычайно трудоемкими и доступными лишь единичным исследовательским коллективам в мире (Tai et al., 2016; Adikusuma et al., 2017; Kim T. et al., 2016; Korablev et al., 2017; Pristyazhnyuk et al., 2019). Вместе с тем, это еще

один важный, но пока дискуссионный и гипотетический путь к так называемой «хромосомной терапии» болезней человека (Kim T. et al., 2014; Plona et al., 2016). В этом отношении, предложенный в диссертации методический подход к созданию тест-системы для выявления хромосомной нестабильности находится на передовом уровне начинающих исследований в данной области.

Наконец, создание подобной тест-системы значительным образом расширяет арсенал и возможности существующих методов тестирования мутагенных эффектов различных факторов физической, химической и биологической природы. При этом стоит отметить, что анеугенные и кластогенные эффекты большинства мутагенных факторов, по-прежнему, остаются недостаточно исследованными, либо неустановленными вовсе. Очевидно, что предложенная тест-система обладает высоким потенциалом к применению для решения и генотоксикологических задач.

Научная новизна исследований и результатов, сформулированных в диссертационной работе

Приоритетная фундаментальная научная значимость результатов работы, несомненно, определяется идентификацией новых генов, нокдаун которых приводит к индукции хромосомной нестабильности. В частности, впервые установлено, что нокдаун пяти генов *PINK1*, *IRAK1*, *PCNK*, *TAOK1* и *TRIO* повышает вероятность потери искусственной хромосомы в созданной автором клеточной системе. При этом принципиальное значение имеет тот факт, что в сфере компетенции каждого из идентифицированных генов стоит тот или иной клеточный процесс или сигнальный механизм, ответственный за сегрегацию хромосом в ходе клеточного деления (индукция двухцепочечных повреждений ДНК, нарушения MAP-сигнального каскада и ряд других). Соответственно, результаты исследования непосредственным образом обозначают новых участников сложного и мало изученного, с молекулярно-генетической точки зрения, процесса трансмиссии хромосом в ходе клеточного деления. Эти участники процесса, в свою очередь, могут явиться потенциальными кандидатами для тестирования на предмет мутационных событий у пациентов с цитогенетическими маркерами хромосомной нестабильности неясной

этиологии. Именно по такому сценарию идет в последнее время описание новых форм хромосомных заболеваний. Так, например, при анализе пациентов с классической клинической картиной синдрома ICF, но с отсутствием мутаций в гене учреждающей ДНК-метилтрансферазы *DNMT3B* на протяжении последнего десятилетия произошло описание трех новых форм синдрома ICF, связанных с мутациями в генах *ZBTB24* (ICF2, de Greef et al., 2011), *CDCA7* (ICF3, Thijssen et al., 2015) и *HELLS* (ICF4, Thijssen et al., 2015). В 2018 году у пациенток с андрогенетическими полными пузырьными заносами (злокачественной хоринэпителиомой) описаны герминативные мутации в гене *MEI1*, определяющие уникальную аномальную сегрегацию всего хромосомного набора в полярное тельце в ходе первого деления мейоза в оогенезе (Nguyen et al., 2018).

Создание эффективной тест-системы на основе искусственной хромосомы человека в клеточной линии фибросаркомы человека для анализа процессов хромосомной нестабильности – еще один ценный научно-практический результат диссертационного исследования. Важно подчеркнуть, что в ходе диссертационной работы разработана и успешно апробирована новая технология, которая открывает возможности не только для изучения фундаментальных механизмов контроля за сегрегацией хромосом, но и для тестирования потенциальных анеугенных эффектов лекарственных препаратов, ориентированных на терапию онкологических заболеваний через индукцию хромосомной нестабильности в опухолевых клетках. Здесь, однако, следует отметить, что связь анеуплоидии с индукцией и развитием опухолевого процесса не всегда однозначна (Ben-David, Amon, 2020). В одних случаях появление анеуплоидных клеток действительно становится драйвером дальнейшего мутационного процесса, прогрессирования и метастазирования опухоли, в других же случаях, например при множественных миеломах или острых лимфобластоидных лимфомах, гипердиплоидное состояние напротив является благоприятным прогностическим маркером. Кроме того, анеуплоидизация клетки не всегда приводит к генерации хромосомной нестабильности (Geigl et al., 2008), как это наблюдается у пациентов с хромосомными заболеваниями, обусловленными полными или сегментными анеуплоидиями. В этой связи

возникает ряд вопросов дискуссионного характера о границах применимости разработанной тест-системы и показаниях для ее использования. Способна ли тест-система детектировать возникновение гипердиплоидии, формирующейся вследствие хромосомного нерасхождения, или ориентирована на выявление исключительно гиподиплоидных состояний, возникающих в результате хромосомного отставания, за счет фиксации события потери искусственной хромосомы? Фактически же, вследствие потери сверхчисленной искусственной хромосомы кариотип клетки должен восстановить свое нормальное диплоидное состояние. В таком случае, может ли, по мнению автора, событие потери искусственной хромосомы в конкретной клетке рассматриваться в качестве синонима явления хромосомной нестабильности, которое носит динамический характер и проявляется возникновением новых (числовых и структурных) хромосомных аномалий на протяжении нескольких клеточных делений? Что известно о кариотипе линии фибросаркомы, использованной в эксперименте?

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертации

В результате выполнения работы сформулировано 3 вывода и 3 положения, вынесенных на защиту. Все выводы и положения являются аргументированными и отражают основные итоги диссертационного исследования. Достоверность полученных экспериментальных данных не вызывает сомнений, поскольку каждый из этапов исследования проведен на репрезентативных выборках клеток, в нескольких повторностях, а также с использованием взаимодополняющих методов и автоматизированных систем анализа изображений. Отдельно стоит отметить объем проведенных экспериментов. Так, для поиска новых генов-кандидатов, ассоциированных с процессом митотической трансмиссии хромосом человека, был проведен скрининг молекулярной библиотеки из последовательностей протеинкиназ в количестве 714 вариантов миРНК.

Структура и содержание работы

Диссертация изложена по традиционному плану и состоит из Введения, Обзора литературы, описания использованных материалов и методов,

отдельных самостоятельных глав «Результаты» и «Обсуждение», Заключение, выводов и списка литературы. Объем работы занимает 146 страниц машинописного текста. Диссертация содержит 14 таблиц и иллюстрирована 28 рисунками. Список литературы включает 195 источников на английском языке по состоянию темы исследования на период до 2019 года.

Во Введении автор обозначает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи работы, ее научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Целью исследования явилась разработка тест-системы для количественной оценки уровня хромосомной нестабильности и поиск новых молекулярных детерминант трансмиссии хромосом в клетках человека. Анализ содержания диссертационной работы позволяет сделать заключение, что ее цель была достигнута в полном объеме.

Обзор литературы формирует представление о структурной и эпигенетической организации хромосомных регионов, значимых для корректного распределения хромосомного материала в ходе митоза, а также об их нарушениях, приводящих к возникновению хромосомной нестабильности. Далее автор описывает модели и методы для анализа хромосомной нестабильности, делая особый акцент на современных технологиях получения искусственных хромосом. Обзор написан хорошим литературным языком, логичен и четко структурирован, базируется на использовании и анализе современных научных данных, опубликованных исключительно в зарубежных изданиях, и отражает компетентность автора в рассматриваемых вопросах.

Глава «Материалы и Методы» дает исчерпывающую информацию об использованных методах исследования и клеточных линиях. Диссертационная работа построена на анализе линии фибросаркомы человека HT1080, в которую была интегрирована созданная в настоящем исследовании искусственная хромосома. Эта конструкция несла в своем составе рекомбинантные кассеты с «сенсорами» клеточного цикла *CDT1* и *GEMININ*, конъюгированными с последовательностями GFP-белка, что обеспечило «прижизненную» визуализацию всех фаз клеточного цикла в эксперименте.

Непосредственное содержание проведенного исследования отражено в главе «Результаты». Данная глава включает 3 раздела, посвященные описанию создания тест-системы на основе искусственной хромосомы для скрининга факторов, вызывающих хромосомную нестабильность, поиску новых кандидатных генов, вовлеченных в процесс хромосомной трансмиссии, и апробации созданной тест-системы для поиска лекарственных препаратов с потенциальным противоопухолевым эффектом, опосредованным возникновением хромосомной нестабильности.

Первый раздел содержит детальную информацию о всех этапах создания тест-системы, включая конструирование плазмидных векторов на основе *E.coli* с последовательностями сенсоров клеточного цикла и белок-кодирующих регионов белка GFP, получение комбинированного шаттл-вектора с обоими сенсорами, его интеграцию в последовательность искусственной хромосомы в линии клеток китайского хомячка, и наконец переноса искусственной хромосомы в клетки-реципиенты HT1080. Далее, на основе анализа продолжительности клеточного цикла в созданной линии клеток была разработана математическая модель, позволяющая вычислять вероятность потери искусственной хромосомы под действием факторов, индуцирующих хромосомную нестабильность. Апробация тест-системы была проведена при воздействии на клеточную линию соединения с известным цитотоксическим действием (таксол) и при нокдауне с помощью РНК-интерференции гена *SKA3*, продукт которого вовлечен в формирование кинетохора.

Поиск новых генов-кандидатов трансмиссии хромосом был проведен, исходя из двух условий. Во-первых, были отобраны гены-ортологи дрожжей *S. cerevisiae* или *S. pombe*, для которых имелось хотя бы единственное упоминание в литературе об их вовлеченности в процессы репликации ДНК или сегрегации хромосом. Во-вторых, для отобранных генов не должно быть известных данных об их участии в репликации ДНК или сегрегации хромосом в клетках человека. Данный подход представляется оригинальным, однако вызывает вопрос о причинах выбора генов указанных двух видов дрожжей в качестве стартовой точки поиска генов-кандидатов хромосомной трансмиссии у человека. Какие особенности

процесса хромосомной сегрегации в клетках дрожжей делают их своего рода эталоном для решения данной задачи?

В результате проведенной селекции по обозначенным критериям автором были выделены 28 генов-кандидатов. Эксперименты с их нокдауном в созданной тест-системе продемонстрировали, что наиболее выраженный эффект на потерю искусственной хромосомы оказывает нокдаун гена протеинкиназы С эпсилон (*PRKCE*), вовлеченной в формирование кинетохора.

Далее был организован масштабный эксперимент по анализу библиотеки миРНК против кодирующих последовательностей протеинкиназ человека, включающей 714 пулов миРНК. В результате эксперимента, сопровождающегося подтверждением результатов с помощью иммуноблотинга и FISH, было показано, что нокдаун 8 генов *IRAK*, *BUB1*, *BUB1B*, *PINK1*, *TAOK1*, *STK38*, *TRIO*, *PNCK* и, собственно, *PRKCE* способен индуцировать статистически значимую потерю кольцевой хромосомы. Нельзя не отметить присутствия в этом списке гена *BUB1B*, гомозиготные или компаундные гетерозиготные мутации в котором известны в качестве этиологического фактора синдрома мозаичной анеуплоидии, тип I (OMIM 257300). Это заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, при котором в клетках пациентов обнаруживаются анеуплоидии, как трисомии, так и моносомии, по разным хромосомам с частотой до 25%.

Завершает главу скрининг 11 экстрактов, полученных из морских беспозвоночных, грибов и высших растений с потенциальными противоопухолевыми эффектами. Из всех исследованных экстрактов статистически значимые отличия по увеличению частоты потери искусственной хромосомы, в сравнении с отрицательным контролем (0,4% DMSO), были получены в отношении экстракта из листьев *Punica granatum*. При этом была продемонстрирована дозозависимая антипролиферативная активность экстракта в отношении клеток тестируемой линии, причиной которой явился блок клеточного цикла на стадии G2.

Глава «Обсуждение» представляет, по существу, выделенный самостоятельный раздел диссертационного исследования. Его содержание построено на сопоставлении технических параметров созданной тест-

системы с существующими методами детекции хромосомной нестабильности (FISH, микроядерный тест). Несомненно, можно согласиться с позицией автора, что заметным преимуществом новой тест-системы является ее пролонгированная способность к фиксации событий потери искусственной хромосомы на протяжении 72 часов.

Следующим существенным элементом является анализ биологических процессов и функций, в реализацию которых оказались вовлечены идентифицированные гены. На фоне теоретически ожидаемых и объяснимых, с точки зрения индукции хромосомной нестабильности, процессов «клеточное деление», «митоз», «сборка цитоскелета», «сигналинг», появление в этом списке генов, относящихся к таким функциональным категориям как «иммунный ответ», «метаболизм» заслуживает самого пристального внимания, как минимум, по двум причинам. Во-первых, это может отражать неизвестный плейотропный эффект некоторых генов, вовлеченных в процессы сегрегации хромосом. Во-вторых, выделенные гены могут маркировать новые патогенетические механизмы развития классических патологических состояний, сопровождающих формирование клинической картины хромосомного заболевания.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов диссертационной работы

Теоретическая значимость результатов исследования определяется, прежде всего, идентификацией ряда новых генов и стоящих за ними пусковых механизмов генерации хромосомной нестабильности. Учитывая накапливающиеся в литературе сведения о значимости феномена нестабильности генома как в раннем эмбриональном развитии человека, так и при многофакторной патологии, включая онкологические заболевания, на поздних стадиях онтогенеза, описанные в диссертационной работе гены могут стать кандидатами для дальнейшего тестирования с точки зрения разработки молекулярно-генетических систем прогноза развития хромосомной нестабильности. Такие системы могут быть востребованы для коррекции курсов терапии онкологических заболеваний, а также в перспективе могут представлять интерес для решения вопроса о переносе

эмбрионов с мозаичной хромосомной конституцией в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения и преимплантационного генетического тестирования.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты диссертационного исследования, касающиеся вопросов регуляции клеточного деления и сегрегации хромосом, рекомендуется включить в профильные образовательные программы высших учебных заведений и постдипломного образования. Разработанная тест-система может быть перспективна для тестирования анеугенных эффектов лекарственных препаратов, используемых для лечения онкологических заболеваний, персонализации курсов терапии, а также для идентификации новых лекарственных мишеней. Тест-система представляет очевидный интерес и для изучения динамики хромосомной нестабильности при других формах социально-значимых многофакторных болезней человека, в том числе атеросклероза и нейродегенеративных заболеваний.

Автореферат диссертации отражает основное содержание проведенных исследований. По материалам работы опубликовано 2 статьи в рецензируемых международных журналах, находящихся в категории Q1 по версии WOS CC и рекомендованных перечнем ВАК РФ (Genome Research, IF=9.9; Oncotarget, IF=5.1). Кроме того, опубликовано 5 тезисов докладов на отечественных и международных научных конференциях.

Заключение

Завершая анализ текста диссертации и автореферата, можно заключить, что работа является законченным, самостоятельным, научно-квалификационным исследованием, результаты которого могут быть классифицированы как решение крупной научной задачи в области клеточной биологии и генетики, связанной с изучением закономерностей генерации хромосомной нестабильности в модельной клеточной системе на основе использования искусственных хромосом. Работа выполнена на самом высоком современном методическом и технологическом уровне, а ее результаты имеют существенное теоретическое и научно-практическое значение. Диссертация Н.В. Гончарова на тему «Тест-система для

идентификации хромосомной нестабильности и новые молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом человека» по своей актуальности, новизне, объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в соответствии с п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в редакциях от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 01.10.2018 г. № 1168), а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, генетика.

Официальный оппонент

Заместитель директора по научной работе

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»,

руководитель лаборатории цитогенетики

Научно-исследовательского института

медицинской генетики Томского НИМЦ

доктор биологических наук, профессор РАН  И.Н. Лебедев

Сведения об официальном оппоненте:

Лебедев Игорь Николаевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», руководитель лаборатории цитогенетики Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5. Тел. (3822) 51-31-46; e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Подпись И.Н. Лебедева 

Ученый секретарь

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», к.б.н.

 И.Ю. Хитринская

« 06 » 04 2020 г.