

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Алексеевой Людмилы Александровны** «Механизм подавления опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»

Актуальность темы исследования.

Молекулярно-биологический диагностический подход в лечении рака используется для скрининга, ранней диагностики, оценки риска, выбора эффективной терапии, мониторинга терапевтического ответа и предотвращения рецидивов онкологических заболеваний. Однако набор существующих сегодня в онкологии методов значительно ограничен, что приводит к неправильной или очень неточной диагностике. Стандартным методом диагностики рака является биопсия тканей, которая представляет собой инвазивную процедуру с рисками осложнений. Доступность материала для биопсии может быть ограничена и не отражает гетерогенность состава опухоли. В качестве альтернативы стандартного подхода в последнее время все больший интерес вызывает внеклеточная ДНК или жидкая биопсия, несмотря на то, что многие аспекты происхождения и метаболизма внеклеточной ДНК остаются неисследованными. Работа Л.А. Алексеевой посвящена изучению подавления инвазивных свойств опухоли под действием ДНКазы I и изменениями в профиле циркулирующих внДНК мышей с различными экспериментальными опухолевыми моделями.

Научная новизна работы.

В работе Алексеевой Л.А. подтверждено антиметастатическое и противоопухолевое действие бычьей панкреатической ДНКазы I на новых типах опухолей. Выявлена неравномерная деградация внеклеточной ДНК с обогащением фракции фрагментов рассеянных повторенных элементов. Полученные предварительные результаты предполагают, что в дальнейшем можно будет использовать анализ баланса последовательностей внДНК для ранней диагностики онкологических заболеваний, для мониторинга течения заболевания и реакции на химиотерапию. Практическая значимость работы заключается в том, что ДНКазы I обладает антиметастатическими свойствами на нескольких моделях опухолей различного гистогенеза и может быть предложена в качестве антиметастатического препарата.

Особый интерес представляют результаты, связанные с воздействием коммерчески доступного препарата Пульмозима на инвазивные свойства опухоли меланомы B16 *in vitro* и *in vivo*. Учитывая то, что данный препарат уже прошел все стадии клинических исследований и рекомендован для лечения заболеваний, связанных с избыточным образованием ДНК в межклеточном пространстве органов пациента, результаты работы Алексеевой Л.А. послужат толчком для запуска новых клинических исследований для апробации препарата в качестве возможного антиметастатического средства.

Общая характеристика.

Диссертация Алексеевой Л.А. имеет традиционную структуру, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и обсуждения, Выводов и Списка цитируемой литературы. Библиография включает 365 источников. Работа изложена на 158 страницах, иллюстрирована 32 рисунками и 15 таблицами. Объем диссертации оптимален для серьезной квалификационной работы. В работе не содержится избыточной информации, и в ней по существу описываются и обсуждаются полученные экспериментальные данные.

Раздел «Введение» содержит необходимую информацию об актуальности темы исследования и степени ее разработанности, о цели и задачах работы, научной новизне, теоретической и практической значимости, методах исследования, достоверности полученных данных. Кроме того, во «Введении» перечислены основные положения, выносимые на защиту, отражены данные по апробации, месту выполнения работы и личному вкладу соискателя.

Обзор литературы соответствует теме исследования и исчерпывающе обосновывает ее актуальность. В обзоре литературы Алексеева Л.А. проводит анализ исторических фактов о внДНК как о возможных маркерах течения опухолевого процесса и терапевтических мишеней. Далее автор описывает различные характеристики внДНК, а также современное понимание её биогенеза в организме. Отдельное внимание автор уделяет изменениям в пуле внДНК при развитии различных заболеваний, в основном, онкологических. Значительная часть обзора посвящена гипотезам о возможной роли внДНК непосредственно в развитии опухолей и распространению метастазов, в частности, подробно рассмотрены работы, посвященные генометастической гипотезе и взаимоотношениям нейтрофильных ловушек и опухолевых клеток. Обзор завершается анализом работ по изучению непосредственного объекта исследования Алексеевой Л.А. – ДНКазы I в качестве антиметастатического препарата и как агента для снижения уровня патологических внДНК. Обзор написан хорошим литературным языком и достаточно легко читается.

Глава «Материалы и методы» содержит информацию об использованных в работе реактивах и буферах, оборудовании, плазмидных конструкциях, праймерах для ПЦР, клеточных культурах, лабораторных животных и опухолевых моделях. Тщательно описаны традиционные методы молекулярной биологии и биохимии, такие как электрофорез, выделение ДНК из клеток и сыворотки крови, амплификация фрагментов ДНК с помощью ПЦР. Кроме того, хорошо описана работа с биологическими объектами, такими как клеточные культуры и лабораторные животные-опухоленосители. Подробно описан протокол конструирования библиотек и подготовка к секвенированию на платформе SOLiD 5500. Завершается методическая часть кратким описанием использованных статистических методов анализа полученных данных. Спектр использованных в работе методических приемов и технологий весьма широк, и все они хорошо подходят для решения поставленных задач.

Полученные в ходе работы Алексеевой Л.А. экспериментальные данные подробно описаны в главе «Результаты и их обсуждение», состоящей из пяти основных разделов.

Первый раздел посвящен действию ДНКазы I *in vitro*. Автор исследует влияние ДНКазы I на жизнеспособность опухолевых клеток, их миграционную активность, а также на концентрацию внДНК в культурах опухолевых клеток. Второй раздел посвящен изучению антиметастатического действия ДНКазы I, а так же влиянию ДНКазы I на циркулирующие внДНК в крови животных с различными типами опухолей и ДНКазную активность крови. Важным результатом является то, что антиметастатический эффект ДНКазы I был обнаружен на всех исследуемых моделях, тогда как влияние на уровень внДНК и ДНКазную активность было показано только на двух моделях из трех. Важно, что автор приводит сравнение своих полученных результатов с результатами других авторов.

Третий раздел главы «Результаты и их обсуждение» посвящен секвенированию внДНК из крови животных с карциномой легких Льюис (LLC) после терапии ДНКазой I с целью поиска молекулярных мишеней ДНКазы I. Основное внимание автор уделяет анализу отличий содержания последовательностей фрагментов повторов в профиле внДНК при развитии опухоли и после лечения ДНКазой I.

Четвертый раздел является логичным продолжением третьего, здесь автор исследует изменение уровня повторенных элементов на нескольких типах экспериментальных опухолей различного гистогенеза, сосредоточившись на SINE и LINE элементах. Автором продемонстрирована связь между снижением уровня фрагментов рассеянных повторов и антиметастатическим действием ДНКазы I. Автором получены предварительные данные, что фрагменты SINE и LINE, полученные из крови мышей с LLC, в сочетании с липофектаминам могут проникать в злокачественные клетки человека в культуре.

В пятом, заключительном разделе, рассмотрены результаты исследования препарата Пульмозим, представляющего собой рекомбинантную ДНКазу I человека, в качестве антиметастатического препарата, в сравнении с бычьей панкреатической ДНКазой I. Найдены общие закономерности для этого класса антиметастатических препаратов. Полученные результаты позволяют рекомендовать Пульмозим для лечения различных типов онкологических заболеваний с метастазами в легких.

Представленные научные результаты, несомненно, вносят большой вклад в понимание метаболизма внДНК и подтверждают высокий потенциал ДНКазы I как антиметастатического препарата.

Достоверность результатов и обоснованность выводов.

В работе Алексеевой Л.А. четко определены и обоснованы актуальность исследований, научная новизна, практическая значимость. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования. Выводы, сделанные в работе на основании анализа полученных результатов, основаны на большом объеме фактического материала. Достоверность положений и выводов подтверждена результатами статистической обработки экспериментальных данных. Материалы диссертации достаточно полно отражены в трех печатных работах в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS, 2 из которых представлены статьями в

высокорейтинговых международных журналах. Во всех статьях Алексева Л.А. является первым автором. В дополнение к этому материалы диссертации были доложены на 6 всероссийских и международных конференциях, тезисы докладов опубликованы.

Значимость работы.

В работе Алексеевой Л.А. исследовано подавление опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I. В частности, было проанализировано изменение профиля внДНК у животных-опухоленосителей под действием двух ДНКаз различного происхождения, и получены предварительные данные о изменении уровня фрагментов онкогенов и рассеянных повторов под действием ДНКаз. Важным результатом является доказательство антиметастатического действия ДНКазы I, продемонстрированного на широком спектре опухолей.

Замечания по работе.

В целом, по работе мне очень понравилась часть, касающаяся анализа эффекта ДНКазы I на опухоли разного генеза и на состав внеклеточной ДНК. Однако данные по анализу состава фрагментов мобильных элементов во внДНК, так и предположения об их роли в метастазировании показались мне предварительными и требующими дальнейшей верификации.

Начиная со стр. 7 (Список сокращений) прослеживается путаница с определением понятий «LINE» и «SINE». Первый расшифрован как «длинные повторяющиеся последовательности», слово «interspersed» («рассеянные»), почему-то опущено. Однако это слово неправильно переведено в описании термина “SINE” как «перекрестные». Это важно для дальнейшего понимания текста, поскольку в классификации повторяющихся последовательностей именно фундаментальное разделение на рассеянные и тандемные повторы является общепринятым и непротиворечивым. Это типы повторов имеют разное происхождение, разную эволюцию и разные механизмы амплификации. Во всех частях диссертации, включая выводы, автор переходит на определение LINE как тандемных повторов, что вызывает большое удивление. Тем более странно, что в обзоре литературы в одном месте они описаны как «диспергированные», что вполне приемлемо. Возможно, если бы эта часть обзора литературы была расширена и автор подробнее описал повторенные элементы, их древнее происхождение (общее для LINE человека и мыши), их активность (подавляющее большинство геномных LINE давно выродились у млекопитающих и не могут быть активированы) в нормальных и раковых клетках, то таких недоразумений удалось бы избежать.

В части обзора литературы, описывающей последовательности онкогенов в крови, почему-то уделено мало внимания феномену амплификации онкогенов в опухолях, именно эта амплификация и отражается в пуле внДНК, о чем пишут авторы процитированных работ (например, про N-MYC онкоген). Именно такую амплификацию стоило бы оценить и в рассматриваемых автором опухолях, где автор видит превышение концентрации фрагментов во внДНК, но почему-то не отмечает, что это отражает амплификацию протоонкогенов в клетках опухоли.

В некоторых случаях автор упоминает факты, которые не подтверждаются при обращении к процитированным работам. Например, на стр. 23 автор говорит об удлинении фрагментов гена APC-1 в крови пациентов с колоректальным раком, однако при изучении первоисточника мы видим «mutant sequences are enriched in small DNA fragments and could not be identified at all in fragments of 1,296 bp.», то есть именно ДНК опухолевого происхождения была фрагментирована сильнее. Авторы далее приходят к заключению о разрушении некротических клеток (как раковых, так и пораженных здоровых) макрофагами, производящими увеличенный пул коротких вДНК.

На стр. 24 говорится о микросателлитных перестройках во вДНК из митохондрий, однако обращение к статье Lopez-Flores, Garrido-Ramoz 2012, не дает никакой информации о вДНК, как и о микросателлитах митохондриальной ДНК, хотя является неплохим обзором повторов эукариот с классическим отнесением LINEs и SINEs к рассеянным элементам.

На стр. 25 дана ссылка на обзор по Alu элементам (Batzer, Deninger 2002), где по утверждению автора диссертации мобильные элементы могут располагаться в тандеме (почему-то приводятся в пример сателлитная ДНК и теломеры). Но авторы обзора имеют в виду мобильные повторенные элементы и четко различают классы тандемных и рассеянных повторов. Даже вышеупомянутая возможность, что иногда МЭ могут оказаться в тандеме, не меняет их классификации. Подавляющее большинство МЭ рассеяны по геному. Также на странице 27 автор говорит, что SINE могут располагаться тандемно и ссылается на статью Singer 1982 года, наверное, опять имеются в виду встречающиеся димерные SINE, что ни в коем случае не делает их тандемными повторами. Автор статьи придерживается вполне стандартной классификации тандемных и рассеянных повторов.

Стр. 26 VNTR – это не «переменное число тандемных повторов», а участок ДНК, состоящий из варибельного числа тандемных повторов.

Автор ссылается на статью Beck et al 2009 о повышенном содержании Alu повторов в вДНК онкологических больных на стр. 26. Указанная статья посвящена концепции здравоохранения и не содержит никакой информации про Alu или даже злокачественные заболевания. Наверное, должна была быть использована ссылка [26], где действительно показано увеличение доли Alu во вДНК онкологических больных на 3%.

В разных разделах диссертации, несмотря на то, что автор приводит убедительные доказательства доминирования во фракции вДНК коротких последовательностей, которые в 50 раз короче целого LINE, почему-то утверждается, что во вДНК содержатся именно LINE, а не их фрагменты, создается неподтвержденная иллюзия того, что эти элементы присутствуют во вДНК в виде целых копий. Работа Mouliere et al 2018 приводит данные о доминировании во вДНК раковых больных фракций меньше 160 нуклеотидов.

Не очень понятно, почему автор называет классические SVA элементы SVT (стр 9 и 28).

В описании диагностики по LINE элементам не указано, что крайне важна степень их метилирования (поскольку LINE опухолевого происхождения отличаются по этой модификации), именно этот признак внДНК и оценивают авторы цитируемых статей на стр. 28.

Очень спорно утверждение, что количество циркулирующих мтДНК в сотни раз превышает количество геномной ДНК (стр. 29). Процитированная статья Chiu et al 2003 такого анализа не приводит, она показывает 5500 кратное увеличение мтДНК относительно одного ядерного гена, а не всего ядерного генома.

На стр. 29 указывается, что метилирование ДНК способствует «стабилизации структуры и ... дает защиту от действия нуклеаз» и нет ссылки на источник. Если имеется ввиду стабилизация дуплексов ДНК (вторичной структуры), то стабильность метилированной ДНК может и понижаться, все зависит от последовательности.

На стр. 35 указывается: «После попадания в клетку-реципиент внДНК экспрессируются, что приводит к увеличению уровня мРНК и белков, закодированных в доставленных внДНК», однако статья приведенной ссылки (Kahlert et al 2014) не содержит такой информации, в ней показывают наличие крупных фрагментов ДНК в экзосомах, в том числе опухолевого происхождения. Там также говорится и о наличии в экзосомах белков и РНК с онкогенной активностью и потенциальной возможности их доставки в клетку-реципиент.

В заключении к обзору литературы неожиданно делается вывод о наличии «постоянного обмена генетическим материалом между организмом и опухолью». Все же были приведены очень редкие случаи доказательства трансформации, и называть это «постоянным обменом» пока преждевременно. Это не исключает, что в дальнейшем будут обнаружены новые доказательства такого обмена.

Рисунок 15. «Увеличение 100x» Не уверен, что увеличение передано точно. В таких случаях принято использовать линейку масштаба изображения.

Среди почти 500 тысяч LINE элементов человека большинство представляют выродившиеся неактивные копии, менее 0,1% этих ретротранспозонов активны (по некоторым оценкам, около 100 копий). Наличие более 99,9 % вырожденных копий в виде фрагментов около 150 пн навряд ли будет иметь функциональное значение даже при встройке в геном. Это необходимо было пояснить. Если бы автор сосредоточился именно на активных элементах, показал их транскрипцию и увеличенную активность в опухолях, то повышенная их концентрация во фракции длинной внДНК имела бы другое значение. А по приведённым данным, похоже, что увеличение их доли может быть связано с динамикой разрушения хроматина, когда более плотно упакованные АТ-богатые у мыши участки генома имеют более долгий период полураспада. Не понятно, почему автор не сосредоточился именно на фракции длинных последовательностей, характерных для экзосом, ведь там можно было показать достаточно крупные фрагменты ДНК, превышающие длину LINE и, возможно, содержащие неповрежденные гены. Секвенирование именно этой, а не тотальной фракции больше бы подходило под идею переноса целых копий активных ретротранспозонов.

Очень странные данные получены при секвенировании вДНК. Если автор получил только 7-8% библиотеки мышинных последовательностей, что собой представляет 92-93% секвенированной ДНК? Осуществлялся ли анализ этих прочтений? Если это контаминация прокариотической ДНК или конкатемерами адаптеров, на каком этапе это могло произойти? Кроме того, при таком низком покрытии критическим становится стохастическое изменение соотношения последовательностей в библиотеках при пробоподготовке и амплификации, и каждая библиотека будет сильно отличаться по составу. Именно поэтому рекомендуется полное или многократное покрытие генома в таких случаях и безусловно, сравнение с геномом опухоли, где соотношения последовательностей обычно отличаются от нормы.

«ВДНК в библиотеке LLC характеризовалась присутствием 3×10^6 GC-обедненных последовательностей ($0 \pm 2\%$ от общего содержания), что в 3 – 6 раз больше, чем в библиотеке LN». 3 миллиона последовательностей это, судя по таблице 11, более половины всех картированных последовательностей, почему это 2% от общего содержания? Очень не хватает анализа секвенированных библиотек с подробным описанием обнаруженных последовательностей, сколько из них настоящих tandemных повторов (у мыши хорошо описана AT богатая сатДНК, которая плотно упакована и наверняка будет перепредставлена в библиотеке деградированного хроматина), сколько рассеянных, сколько кодирующих участков генома.

Эксперимент по интернализации вДНК мыши в опухолевые клетки человека на вряд ли свидетельствует о способности повторов участвовать в глобальном межвидовом переносе. Если же это понятие брать слишком широко, то большинство экспериментов с трансфекцией эукариотических клеток — это вполне «межвидовой перенос». Я бы рекомендовал более осторожно использовать этот термин и говорить о полученных предварительных данных. Иначе у читателя может сложиться неверное впечатление о горизонтальном переносе, который встречается крайне редко, и более характерен для ДНК-транспозонов, чем для ретротранспозонов, и должен затрагивать перенос и интеграцию в геном клеток зародышевого пути.

В целом, теория распространения метастазов путем трансформации здоровых клеток вДНК и роли в этом процессе мобильных элементов является чрезвычайно интересной, но пока мало доказанной. Несомненно, данная теория требует дальнейшего экспериментального подтверждения, пока же полученные данные необходимо трактовать очень осторожно.

Заключение.

Диссертационная работа Алексеевой Людмилы Александровны «Механизм подавления опухолевой прогрессии под действием ДНКазы I», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия», представляет собой завершённое научное исследование, выполненное на высоком уровне, имеющее очевидное научно-практическое значение и добавляющее

новое знание в области фундаментальных знаний о процессах метастазирования и динамики вДНК в норме и при патологии.

Несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и рекомендательный характер, диссертационная работа Алексеевой Л.А. по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 «биохимия» (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Алексеева Л.А., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 «биохимия» (биологические науки).

9 декабря 2020

Заведующий лабораторией
Отдела разнообразия и эволюции геномов
Лаборатории сравнительной геномики
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения РАН

д.б.н.

В.А. Трифонов

Адрес: 630090, Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8/2
Рабочий телефон: 8(383) 363-90-62
e-mail: vlad@mcb.nsc.ru

Подпись д.б.н. В.А. Трифонова заверяю:

Ученый секретарь ИМКБ СО РАН

к.б.н.



Л.Г. Ахмерова