

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук
Кудрявцевой Анны Викторовны
на тему: «Молекулярно-генетические нарушения энергетического
обмена опухолевых клеток»
по специальности 1.5.3.– молекулярная биология

В диссертационной работе А.В. Кудрявцевой представлены результаты исследований молекулярно-генетических изменений на уровне структуры и регуляции экспрессии генов, влияющих на энергетический обмен опухолевых клеток, и оценки возможности их применения в клинической практике в качестве диагностических и прогностических маркеров. Несмотря на то, что нарушения энергетического метаболизма в опухолевых клетках, а именно, переключение с митохондриального дыхания на гликолиз, были выявлены Варбургом еще в 1926 году, молекулярные механизмы этого процесса до сих пор недостаточно хорошо изучены. Считается, что активация гликолиза связано не только с гипоксией и нарушением функций митохондрий, но и с потребностью клеток в промежуточных продуктах гликолиза в условиях активного роста и деления клеток. Тем не менее, это явление не является универсальным для всех видов рака, например, в опухолях толстой кишки значимой активации гликолиза не наблюдается. Актуальной является как задача характеристики особенностей изменения энергетического обмена для различных нозологических категорий, выявления всего разнообразия молекулярных механизмов регуляции соответствующих генов и метаболических путей, построения генных и метаболических сетей. Также актуальной задачей является поиск диагностических и прогностических молекулярно-генетических маркеров для онкологических заболеваний. Такими маркерами могут быть гены, относящиеся к энергетическому метаболизму. Для решения этих задач необходимо проведение комплексных исследований с использованием различных «омиксных» технологий, что и является предметом диссертационной работы.

Диссертация представлена в виде научного доклада, подготовленного на основе совокупности ранее опубликованных работ соискателя. Такой формат очевидным образом не позволяет привести всю совокупность полученных данных, но все ключевые компоненты работы присутствуют и позволяют провести ее экспертизу. После небольшой вводной части с обоснованием актуальности исследования, диссертант формулирует цель работы, - анализ молекулярно-генетических нарушений, влияющих на энергетический обмен опухолевых клеток и оценка потенциала их применения в клинической практике, и формулирует основные задачи, соответствующие разделам «Результатов».

Оценивая методический уровень работы, следует отметить применение автором комплексного подхода, включающего экспериментальные методы анализа генома и экспрессии генов (экзомное секвенирование, секвенирование транскриптомов, бисульфитное секвенирование для характеристики паттернов метилирования, количественную оценку уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени и др.) и методы биоинформатики для анализа мутаций, дифференциальной экспрессии генов, альтернативного и абберрантного сплайсинга в общедоступных базах данных. Кроме этого применялись методы работы с культурами клеток и методы гистологического анализа.

Важным фактором успеха работы стало использование хорошо охарактеризованных образцов опухолевых и контрольных тканей, предоставленных НМИЦ радиологии Минздрава РФ и в НМИЦ хирургии имени А. В. Вишневского Минздрава РФ.

В первом разделе Идентификация нарушений экспрессии генов, продукты которых участвуют в энергетическом обмене и его регуляции при злокачественных новообразованиях. Прежде всего, диссертантом разработан программный пакет CrossHub, с помощью которого можно проводить анализ данных консорциума «TCGA» (The Cancer Genome Atlas), а именно анализ дифференциальной экспрессии генов и предсказание механизмов регуляции экспрессии, а также выявлять ассоциации между уровнем экспрессии генов и клинико-патологическими характеристиками опухолей. С помощью этого инструмента проанализированы изменения экспрессии в опухолях генов энергетического метаболизма для колоректального рака, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака легкого и рака почки. Было показано, что в целом в опухолевых тканях повышалась экспрессия генов гликолиза и снижалась экспрессия генов цикла трикарбоновых кислот, хотя для разных генов и типов раков картина отличалась. Экспериментальная валидация была проведена методом РТ-ПЦР на российской популяции на разных типах опухолей. Хотя ни для одного из проанализированных генов не наблюдалась однонаправленных изменений экспрессии для всех образцов, ряд статистически значимых изменений был выявлен, например, при раке предстательной железы было выявлено существенное повышение экспрессии гена гексокиназы HK2.

В следующем разделе А.В. Кудрявцева выявляет механизмы онко-ассоциированного изменения экспрессии генов, вовлеченных в энергетический обмен. Проанализированы различные механизмы регуляции - участие транскрипционных факторов (Мус и СВХ3), влияние микроРНК на экспрессию HK2 при колоректальном раке, а также альтернативный сплайсинг. Эти работы позволили установить механизмы регуляции экспрессии ряда генов. В этом же разделе исследуются эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, вовлеченных в энергетический метаболизм опухолевых клеток при раке толстой кишки. В опухолях с метилаторным CIMR-фенотипом выявлено повышение экспрессии многих генов, вовлеченных в гликолиз и связанные с ним процессы и снижение экспрессии гена OGDHL, вовлеченного в цикл трикарбоновых кислот. Для этого гена на образцах российской популяции был выявлен гиперметилированный участок промотора. Специфический паттерн метилирования и снижение уровня мРНК гена OGDHL может служить дополнительным маркером CIMR-high фенотипа при аденокарциноме толстой кишки.

Во второй части работы автор ставит задачу поиска потенциальных прогностических и предиктивных маркеров среди генов, связанных с энергетическим обменом. Задача оказалась непростой, поскольку как уже отмечалось выше, изменение экспрессии для конкретных генов зависело от типа опухоли и не было «универсальным». Например, экспрессия гена HK2 повышалась в 73% образцов тройного негативного рака молочной железы, а при люминальном А типе рака молочной железы – только в 26% образцов. Тем не менее, ряд генов, вовлеченные в энергетический обмен, имеют перспективы стать прогностическими маркерами в составе диагностических панелей, увеличивающих предсказательную силу по сравнению с индивидуальным маркером. Также был проведен поиск/тестирование возможных терапевтических мишеней, в качестве которой рассматривается гексокиназа HK2. С использованием лентивирусного

вектора была получена модифицированная клеточная линия RKO с пониженным уровнем экспрессии НК2. В этой линии также был снижен и уровень экспрессии и некоторых других генов гликолиза.

Далее в работе исследовался вопрос о взаимосвязи между активацией гликолиза и гиперметилованием генома в опухолях с CIMP+ фенотипом. В CIMP-high опухолях было выявлено повышение уровня экспрессии ряда генов, вовлеченных в гликолиз и связанные с ним процессы, по сравнению с non-CIMP опухолями, а также снижение уровня экспрессии гена пируваткиназы PKLR, принимающей участие в глюконеогенезе. Возможно, что речь идет не только о корреляции, но и причинно-следственной связи, как в случае, регулирования гена OGDHL посредством метилирования промотора.

Поскольку считается, что CIMP+ фенотип связан с большей агрессивностью и худшим прогнозом, как минимум, при колоректальном раке, далее автор поставил задачу оценки роли драйверных мутаций в формировании CIMP+ фенотипа. Было установлено, что 60% гипермутантных опухолей содержат мутации в гене системы репарации MLH, наряду с высокой частотой мутаций в гене BRAF и повышенным общим мутационным фоном.

Особенностью рака толстой кишки является влияние на его развитие микробиоты кишечника. В частности, предполагается, что существует ассоциация между воспалением толстой кишки, а также прогрессией рака толстой кишки, с инфекцией энтеротоксигенной *Bacteroides fragilis* (ETBF). Поэтому далее диссертантом был исследован вопрос о роли микробиоты в патогенезе рака толстой кишки и особенностях энергетического обмена опухолевых клеток. Продуцируемый ETBF токсин вызывает активацию спермин оксидазы (SMO), которая отвечает за образование спермидина и перекиси водорода в качестве побочной реакции катаболизма полиаминов. Перекись водорода, в свою очередь, усиливает воспаление и повреждение тканей. Однако, в работе было установлено, что активация метаболизма полиаминов при раке толстой кишки вероятно обусловлена не инфекцией ETBF, а другими факторами. Известно, что микробиота кишечника может образовывать короткоцепочечные жирные кислоты, в частности бутират, используемые хозяином. Поэтому авторы предположили, что отсутствие заметной активации гликолиза при колоректальном раке связано с тем, что вместо метаболизма глюкозы клетка может продолжать использовать бутират, синтезируемый микробиотой кишечника.

В заключительном разделе диссертации представлены результаты исследований механизмов действия средств продления жизни (геропротекторов), а также генетических особенностей долгоживущих млекопитающих. Исследовано влияние фукоксантина, продлевающего жизнь дрозophil, на экспрессию генов, вовлеченных в различные метаболические процессы. Выявлено изменение экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез ненасыщенных жирных кислот, гликолиза и пентозофосфатного пути. Однако, сложно сказать является ли именно это причиной (или следствием) замедленного строения. Также проведена *de novo* сборка генома и анализ транскриптома долгоживущего животного – серого кита. Выявлены высокий уровень экспрессии генов репарации ДНК, убиквитинилирования, апоптоза и иммунного ответа, что наблюдалось и у других долгоживущих животных.

Очевидно, что А.В. Кудрявцевой проделана большая и важная научная работа. Как и любая другая такая работа, эта диссертация имеет и ряд недостатков и вызывает вопросы.

Прежде всего, отметим эксперимент по экспрессии гексокиназ при колоректальном раке (рис. 4). Из этих данных видно, что экспрессия НК1 изменяется мало, экспрессия НК2 снижается в большинстве опухолей и только НК3 индуцируется в большинстве образцов. Поскольку изменения зачастую разнонаправленные, интересно было бы посмотреть и сравнить еще и уровни экспрессии трех форм НК. Если какой-то ген экспрессируется на более высоком уровне по сравнению с двумя другими, то он и будет определять суммарный эффект. Также было бы полезно провести аналогичный анализ для других генов гликолиза, в первую очередь имеющих одну копию, и посмотреть будет ли изменение их экспрессии в разных образцах коррелировать с экспрессией какой-то из гексокиназ и других генов гликолиза. Без этого, по одной только гексокиназе, сложно сделать вывод об активации гликолиза как полного пути, возможно речь идет об особенностях опухолевых тканей, влияющих только на отдельные гены.

В разделе 3.4.2 приводятся данные о том, что согласно эксперименту по преципитации белков семеногелины ассоциированы с 119 белками, в числе которых два пируваткиназа М2 (PKM2) и лактатдегидрогеназа А (LDHA). Предполагает ли автор, что эти белки образуют какой-то комплекс *in vivo*, что было бы весьма неожиданным с учетом большого различия функций этих белков. Этот вопрос было бы полезно обсудить.

В разделе 4.1 приводятся данные о том, что экспрессия гена НК3 коррелирует с уровнем мРНК ряда транскрипционных факторов, играющих ключевую роль в процессе эпителиально-мезенхимального перехода, а также двух других его участников (GREM1 и COL1A1). Из этого автор делает предположение, что НК3 вовлечена в процесс эпителиально-мезенхимального перехода. Однако, корреляция двух событий не обязательно означает причинно-следственную связь, для такого предположения нужны дополнительные данные.

В разделе 7 делается предположение о том, что при колоректальном раке вместо метаболизма глюкозы клетка может продолжать использовать бутират, синтезируемый микроорганизмами, населяющими просвет кишечника, и поэтому активация гликолиза не требуется. Пути утилизации бутирата известны, было бы логично посмотреть, действительно ли соответствующие гены индуцируются в опухолевых тканях. Такой анализ позволил бы обосновать п. 6 положений, выносимых на защиту и соответствующий вывод.

В разделе 8 в эксперименте по добавлению в корм дрозофил фукоксантина показано, что при старении самцов мух, содержащихся на диете с фукоксантином, снижение экспрессии генов ряда метаболических путей (напр. метаболизма жирных кислот) было менее выраженным по сравнению с контрольной группой. Но у самок такого эффекта не наблюдалось. Такие отличия было бы полезно обсудить и объяснить.

Также имеются недостатки в оформлении работы. В первую очередь это относится к рисункам, подписи к которым малоинформативны и в ряде случаев не позволяют понять, что именно на них показано. Например, рисунки 10 и 12 в которых нет содержательных подписей. На рис 17 можно предположить, что прямоугольники иллюстрируют возраст мышей, но четкого обозначения нет. В то же время некоторые

данные избыточны, например, таблицы 1 и 2 с первичными данными по экспрессии. Встречаются также неудачные выражения. На стр. 27 присутствует фраза «CIMP-low аденокарцинома толстой кишки, преимущественно принадлежащая к консенсусному молекулярному подтипу 3 (CMS3, «Metabolic»), ассоциирована с повышенной экспрессией генов, принимающих участие в метаболических путях». Непонятно о чем идет речь. Все гены прямо или косвенно влияют на различные метаболические пути.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования и являются в основном предложениями по анализу и объяснению результатов, а также связаны с оформлением работы.

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 79 статьях в рецензируемых научных журналах и 4 патентах, причем 43 статьи опубликованы в изданиях первого и второго квартилей.

Таким образом, диссертационная работа А.В. Кудрявцевой является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области исследования нарушений энергетического обмена опухолевых клеток.

Диссертационная работа отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также надлежащим образом оформлена.

Таким образом, соискатель Кудрявцева Анна Викторовна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Равин Николай Викторович

доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Адрес: 119071 г. Москва, Ленинский просп., д.33, стр. 2

эл. почта: nravin@biengi.ac.ru

Подпись Н.В. Равина заверяю:

