

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук

Каюмова Айрата Рашитовича на диссертационную работу

**Мохамеда Ислама Сабер Еада**

«Молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы)», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

### **Актуальность темы исследования**

Токсическое действие экзогенных рибонуклеаз (РНКаза) на опухолевые клетки исследуется достаточно давно. Исследователи обратили внимание на экзогенные РНКазы различного происхождения, для которых была обнаружена цитотоксическая и противоопухолевая активность: РНКазу семенников быка (BS-РНКаза), ооцитов лягушки *Rana pipiens* (онконазу), микробные РНКазы *Streptomyces aureofaciens* (РНКаза Sa3), *Bacillus intermedius* (биназа).

РНКаза А из поджелудочной железы крупного рогатого скота (РНКаза А) представляет собой небольшой белок (124 аминокислоты, 13.7 кДа), обладает самой высокой каталитической активностью среди белков семейства и была одной из первых рибонуклеаз, для которой была изучена цитотоксическая активность в отношении опухолевых клеток. Первые эксперименты показали, что РНКаза А не проявляет цитотоксического действия *in vitro*, а *in vivo* оказывает слабое противоопухолевое действие. В одних исследованиях было показано, что РНКаза А ингибирует рост опухоли у мышей и крыс, в то время как в других - наблюдалось отсутствие как цитотоксического, так и противоопухолевого действия. Отсутствие противоопухолевого действия РНКаза А объясняли ее инактивацией под действием связывания с внутриклеточным ингибитором рибонуклеаз (RI). Одним из значимых факторов цитотоксичности рибонуклеаз по отношению к опухолевым клеткам является их способность избегать связывания с цитоплазматическим ингибитором рибонуклеаз.

Микробные рибонуклеазы, к которым относится биназа из *B. pumilus*, представляют интерес для исследователей с точки зрения их возможной противоопухолевой активности. Эти рибонуклеазы относятся к семейству РНКазы T1, и, хотя они существенно (на четыре порядка) менее активны, чем РНКаза А, обладают значительной цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам, так как не связываются с RI.

Несмотря на большой интерес исследователей к цитотоксичным РНКазам, механизмы, определяющие их цитотоксичность, до сих пор недостаточно изучены, особенно мало сведений о начальных этапах взаимодействия экзогенных РНКаз с опухолевой клеткой.

Диссертационная работа Мохамеда Ислама Сабер Еада, посвящённая выяснению молекулярных механизмов взаимодействия экзогенных рибонуклеаз биназы и РНКазы А с опухолевыми клетками в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, является, несомненно, актуальным исследованием.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа оформлена на 145 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 27 рисунков. Библиография включает 310 наименований.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, посвящена экзогенным рибонуклеазам с противоопухолевым и противовирусным действием и обсуждены механизмы их цитотоксичности и противоопухолевой активности. Подробно рассмотрено РНКазы с противоопухолевой и противовирусной активностью, принадлежащие семейству РНКазы А и РНКазы G1. Отдельно описаны РНКазы с противоопухолевым действием в клинических испытаниях.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В работе применялись стандартные методы выделения РНК, ПЦР в реальном времени, методы оценки миграции и инвазии опухолевых клеток, метод проточной цитофлуорометрии, конфокальной микроскопии, методы молекулярного моделирования и биоинформатического анализа. В работе использовали стандартные методы работы с культурами клеток *in vitro* и с опухолевыми моделями на мышах *in vivo* в соответствии с этическими протоколами.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» содержится изложение полученных результатов и аргументированный анализ их в сравнение с литературными источниками. Представлены результаты исследования влияния РНКазы А и биназы на снижение злокачественного потенциала опухолевых клеток от *in vitro* до *in vivo*. Во второй части данной главы представлены результаты поиска миРНК, чувствительных к биназе и РНКазе А, и биоинформатический анализ мРНК, которые являются мишенями РНКазы А и биназа-чувствительных миРНК.

Описанные результаты хорошо демонстрируют логику исследования и проиллюстрированы многочисленными рисунками и таблицами, которые облегчают восприятие материала.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту шесть научных положений, логично вытекающих из анализа результатов исследования. Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

#### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

Данная работа представляет собой фундаментальное исследование, в ходе которого были выяснены молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *B. pumilus* (биназы).

Автором показано, что РНКазы А эффективно накапливаются в клетках меланомы В16 мыши и клетках эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека. После проникновения РНКазы А в клетки HeLa и В16 часть фермента остается свободной, не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня цитозольных РНК в обоих типах клеток и рРНК в ядрышках клеток HeLa. Показано, что РНКазы А после проникновения в клетки ко-локализуются вместе с внутриклеточным гетеродимерным белком Ku70/Ku80 в цитозоле и ядре клеток, что может указывать на участие белков Ku70/Ku80 во внутриклеточном транспорте РНКазы А.

Показано, что РНКазы А подавляет миграцию и инвазию опухолевых клеток *in vitro*, но не подавляет их жизнеспособность; биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию. Впервые на метастатической модели меланомы В16 *in vivo* показано, что РНКазы А подавляет метастазирование в легкие, меняет профиль микроРНК и экспрессию ЕМТ-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли. На модели лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS40 показано, что биназа замедляет рост первичной опухоли, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль микроРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней реактивной воспалительной инфильтрации и количества митозов.

Показано, что основными биологическими процессами, модулируемыми РНКазой А в микроокружении опухоли, являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с ЕМТ и опухолевой прогрессией. Основными событиями, модулируемыми биназой в опухолевой ткани, являются пролиферация, миграция, апоптоз и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

#### **Достоверность и обоснованность результатов исследований**

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки. Результаты работы представлены в 3 публикациях в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, из них 2 статьи в базах научного цитирования Scopus и Web of science, доложены и обсуждены на 7 российских и международных научных форумах и конференциях.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации.** Содержание автореферата полностью отражает основные идеи и выводы диссертационной работы.

#### **Достоинства и недостатки диссертационной работы, замечания по работе.**

Основным достоинством работы является комплексный подход, который позволил провести практически полный цикл лабораторных исследований противоопухолевого эффекта РНКаз. Представлена комплексная работа, которая начинается с моделирования взаимодействий белков *in silico*, далее проведены эксперименты *in situ* и *in vivo* в клетке на уровне отдельных молекул и завершается работой верификацией эффектов на животных моделях на уровне тканей и транскриптома.

В ходе прочтения работы возникли следующие **замечания**:

1. Микрофотографии флуоресцентной микроскопии в работе представлены в маленьком размере, что сильно затрудняет их анализ. Также автору стоило повысить яркость и контрастность отдельных снимков.
2. Раздел по взаимодействию РНКазы с белком КУ представлен неубедительно, по данным микроскопии нельзя делать вывод о взаимодействии белков, а только о их ко-локализации (Рис. 8). По мнению рецензента, для оценки взаимодействия белков в таких задачах нужно либо делать ко-элюцию (ко-иммунопреципитацию), или колокализацию после сшивки белков (например, глутаровым альдегидом) с дальнейшим иммуноблоттингом. Также напрашивается оценить взаимодействие *in vitro* на очищенных белках.
3. В экспериментах по КЛСМ РНКазы была сшита с биотином. Однако в клетку биотин транспортируется и связывается целым рядом биотин-связывающих белков и в работе не хватает контроля, где было бы показано проникновение в клетку А-биотина, окрашенного стрептавидином-АРС.
4. В Положениях использовано не очень удачное выражение «РНКазы А эффективно накапливается», потому что термин «эффективно» применим к эффекту, а не процессу. Необходимо пояснить, что имеется в виду – накапливается быстро, в большом количестве?

#### **Вопросы:**

1. Насколько специфично РНКазы проникают именно в опухолевые клетки? И если специфичным, каковы механизмы этой специфичности? В обзоре литературы указано, что перерожденные клетки несут отрицательный заряд, но почему он не компенсируется ионами и другими белками? Есть ли данные о сродстве РНКаз к опухолевым и нормальным клеткам?
2. Был ли контроль условно-нормальных клеток этой ткани? Что происходит в не опухолевых клетках при введении РНКазы А? Те же самые процессы?

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация Мохамеда Ислама Сабер Еада «Молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы)», выполненная под руководством доктора биологических наук Мироновой Надежды Львовны в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН является законченной научно - практической работой. На основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно определить как новое достижение в биохимии, молекулярной биологии. В диссертации решается актуальная проблема - изучение молекулярных механизмов, опосредующих противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *B. pumilus* (биназы). В частности, впервые доказано, что основными биологическими процессами, модулируемыми РНКазой А в микроокружении опухоли, являются регуляция клеточной адгезии, сигнальные пути,

связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT) и опухолевой прогрессией, а модулируемыми бионазой - пролиферация, миграция, апоптоз и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

В целом по актуальности темы, объёму, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация отвечает требованиям установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, а также критериям определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней Института химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медициной СО РАН. Автор диссертации, Мохамед Ислам Сабер Еад, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент,

Каюмов Айрат Рашитович, д.б.н., в.н.с.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,



А.Р. Каюмов

15.06.2022

Адрес организации: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Адрес: 420008, Россия, РТ, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

public.mail@kpfu.ru, e-mail: Ajrat.Kajumov@kpfu.ru, +7(904)665-19-08

