

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию Савельевой Анны Валентиновны «Распределение внеклеточных РНК во фракциях плазмы крови человека и влияние нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов таких РНК в клетки млекопитающих», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Малоинвазивная молекулярная диагностика заболеваний человека является активно развивающимся направлением. Поиск диагностических и прогностических маркеров – достаточно отработанная область, однако в контексте «жидкой биопсии», а именно анализа профиля мутаций, транскриптов и прочих молекул в плазме крови, имеются определенные трудности. Несмотря на то, что исследования биогенеза и динамики состава внеклеточных мембранных везикул (экзосом, апоптотических телец и микровезикул), а также белковых РНК-содержащих комплексов ведутся уже достаточно давно и доказали свою информативность, по-прежнему мало известно о распределении внеклеточных РНК по фракциям крови в норме и при патологии. В связи с этим, особенную актуальность представляет диссертационная работа Анна Валентиновны Савельевой, посвященная изучению РНК-состава фракций крови методом высокопроизводительного секвенирования платформы SOLiD.

Диссертация А.В. Савельевой написана по традиционному плану, состоит из Введения (4 стр.) и трех глав: Обзор литературы (23 стр.), Экспериментальная часть (18 стр.), Результаты и обсуждение (36 стр.). Также содержит Заключение (2 стр.), Выводы (1 стр.) и Список литературы (24 стр., 270 ист.).

Во Введении обосновывается актуальность темы, формулируются цели и задачи исследования, приводится научная новизна и практическая значимость. Далее перечисляются положения, выносимые на защиту, даются сведения о личном вкладе автора в проделанную работу, а также об апробации работы и имеющихся у автора публикациях. Автором опубликованы в соавторстве 2 работы в отечественных и 2 в зарубежных журналах.

Глава 1 - Обзор литературы. Эта глава начинается с введения терминологии. Далее следует информация о биогенезе внеклеточных циркулирующих комплексов, а

именно об их формировании, секреции и интернализации, а также информация о транспорте белковых и РНК-составляющих разных классов в такие комплексы. Затем приводятся современные данные об участии РНК-содержащих внеклеточных комплексов в развитии физиологических и патологических процессов человека. Обзор литературы написан хорошим научным языком, проиллюстрирован и хорошо логически связан с последующим текстом диссертации.

Глава 2 – Экспериментальная часть. В этом разделе в деталях описываются основные экспериментальные процедуры и биоинформационный анализ.

Глава 3 - Результаты и обсуждение. Доботно написанный и прекрасно проиллюстрированный раздел. Анной Валентиновной проведена работа по фракционированию крови здоровых доноров и больных немелкоклеточным раком легкого с последующим анализом морфологии, антигенного состава и гидродинамических размеров частиц в полученных фракциях. РНК-материал фракций был конвертирован в кДНК-библиотеки, состав которых был проанализирован методом высокопроизводительного секвенирования на платформе SOLiD. В результате этого анализа были идентифицированы мажорные РНК-составляющие различных классов, характерные для каждой из пяти фракций, а также отличающиеся по представленности между образцами, полученными от здоровых и больных. Далее, работа была сфокусирована на крайне интересном и необычном классе молекул: на кольцевых РНК. Были обнаружены ранее неописанные транскрипты и проведен qPCR-анализ относительного распределения кольцевых РНК и их линейных форм во фракциях крови. Наконец, был получен рекомбинантный нуклеофозмин 1 человека и исследована возможность использования этого белка в качестве доставщика структурированных РНК в клетки человека.

Высоко оценивая научный уровень и практическую значимость проведенных Анной Валентиновной исследований, тем не менее, хотелось бы сделать некоторые технические замечания:

1. В работе используются образцы плазмы, полученные смешиванием от нескольких доноров. В то время как такой шаг полностью оправдан ввиду ограниченного количества материала от больных доноров, было бы крайне желательно привести доказательства того, что эта процедура не отражается значимым образом на составе микрочастиц фракций, а также что сумма РНК-профилей индивидуальных образцов предсказуемо соответствует

профилю «смешанного» образца. Очевидно, что использование образцов от индивидуальных доноров гораздо более информативно по многим параметрам, - как минимум, это позволяет оценить вариабельность уровней каждого из обнаруженных РНК-маркеров и гораздо более уверенно говорить о мажорных РНК-компонентах фракций (как инвариантных, так и дифференциально экспрессирующихся между сравниваемыми образцами).

2. Использование платформы SOLiD в сочетании с модификацией протокола приготовления библиотек несколько осложняет проведение прямых сравнений с данными, полученными другими авторами. Во избежание построения аргументации на искажениях в данных, связанных с использованием конкретной платформы, мне кажется уместной их более обширная валидация другими методами, несмотря на крайнюю дороговизну таких экспериментов.

3. В разделе, посвященном анализу распределения кольцевых РНК во фракциях крови, было бы крайне желательно привести информацию о выборе гена-нормализатора для проведения qPCR и обосновать этот выбор.

4. Эксперименты по выделению рекомбинантного нуклеофозмина из клеток *E. coli* с последующей гель-ретардацией и доставкой синтетических аналогов внеклеточных РНК выглядели бы более убедительно, если бы была приведена информация об отсутствии связывания выделенного рекомбинантного нуклеофозмина с эндогенными структурированными РНК *E. coli* (или об отсутствии влияния такого связывания на результаты гель-шифт анализа с целевыми РНК) и проведен более аккуратный выбор сравниваемых синтетических РНК (например, одинаковых по длине и близких по составу, но отличающихся по наличию вторичной структуры, и наоборот).

Подчеркну, что перечисленные замечания носят исключительно технический характер, не сказываются на выводах работы и нисколько не снижают ее научной ценности.

Результаты диссертационной работы Анны Валентиновны Савельевой суммированы в 5 выводах, которые полностью и объективно отражают суть проведенного исследования.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Научная новизна полученных результатов, и их практическая значимость очевидны. Впервые проведен сравнительный анализ РНК-составляющих циркулирующих

внуклеточных комплексов различных фракций крови здоровых доноров и больных немелкоклеточным раком легкого. Выявлены маркерные РНК, характерные для каждой из фракций и отличающиеся между здоровыми и больными. Впервые описаны 8 форм кольцевых РНК и подтверждено присутствие некоторых из известных кольцевых РНК в составе везикулярных частиц плазмы крови. Полученные данные об относительном содержании РНК-компонент во фракциях крови в перспективе могут послужить основой для разработки чувствительных способов малоинвазивной детекции рака легкого и других патологий человека.

Заключение


Диссертационная работа Анны Валентиновны Савельевой по объему, новизне, актуальности, достоверности данных, обоснованности выводов и уровню публикаций полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», поскольку в ней решен ряд важных научных задач и внесен существенный вклад в развитие методов молекулярной диагностики патологий человека. Таким образом, Анна Валентиновна Савельева заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент,

к.б.н., с.н.с. лаборатории иммуногенетики

ИМКБ СО РАН

28.04.2017

 Горчаков А.А.

Горчаков Андрей Александрович, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии, СО РАН.

г. Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева 8/2.

тел (383)363-90-72, e-mail: gorchakov@mcb.nsc.ru

Подпись с.н.с. лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН Горчакова Андрея Александровича удостоверяю:

Ученый секретарь ИМКБ СО РАН, к.б.н.



 Акхмерова Л.Г.