

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора
Шевченко Валерия Евгеньевича
на диссертационную работу Новиковой Светланы Евгеньевны
на тему: «Транскриптомика и протеомика индуцированной
дифференцировки клеток линии HL-60», представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность темы исследования

Актуальность темы диссертационной работы **Новиковой Светланы Евгеньевны** не вызывает сомнения так, как посвящена изучению молекулярных механизмов дифференцировки промиелоцитов в функциональные нейтрофилы под действием полностью-транс-ретиноевой кислоты (ATRA), лежащей в основе терапии острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ). Внедрение препаратов ATRA и ее дериватов в клиническую практику позволило добиться ремиссии у 90-95% больных ОПЛ. Однако она часто не является долгой, возникают рецидивы из-за резистентности к ATRA терапии, кроме того дифференцирующая терапия может сопровождаться опасным для жизни осложнением – синдромом дифференцировки. Изучение молекулярной основы ATRA-индуцированной дифференцировки относится к приоритетным направлениям развития биомедицинской науки, позволит получить более полное представление о процессе созревания гранулоцитов, а также определить потенциальные мишени для альтернативных или потенцирующих действий ATRA лекарственных препаратов и возможности преодаления лекарственно устойчивости.

Объект исследования

Объектом исследования была выбрана линия клеток промиелоцитарного лейкоза человека HL-60, широко используемая в качестве модели для изучения ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки.

Достоверность результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследования и сделанные из них выводы основаны на фактическом экспериментальном материале. Транскриптомное и протеомное профилирование клеток HL-60 до и после ATRA – индуцированной дифференцировки, составляло основу диссертационной работы и выполнялось в 3 биологических повторах, в то время как панорамные и таргетные масс-спектрометрические эксперименты осуществлялись в 5 технических повторах для каждого образца. Все измерения проводились диссертантом квалифицированно на современном оборудовании, что позволило получить статистически значимые результаты и сделать достоверные выводы.

Научная новизна

Впервые использован системный подход для мониторинга молекулярной динамики индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60 с одновременным профилированием уровня мРНК и белков и компиляции полученных данных для создания модели биологического процесса. Впервые применен направленный масс-спектрометрический анализ в режиме

мониторинга параллельных реакций и в режиме мониторинга выбранных реакций для оценки количественного профиля 18 и 10 белков, участвующих в ATRA-индуцированной дифференцировке. Впервые создана модель биологического процесса, основанная на результатах как протеомного, так и транскриптомного профилирования. Использование транскриптомных и протеомных данных позволило определить молекулы модельной схемы с измененной экспрессией. Ключевая молекула – поли(АДФ)-рибоза полимераз (PARP1) – и транскрипционный фактор – гиперметилованный при раке белок 1 (HIC1) – были выявлены как наиболее значимые молекулы в модельной схеме. Также применив методы транскриптомики и протеомики, для тирозиновых протеинкиназ LYN и FGR, протоонкогена VAV1, регулируемой PML-RAR α адаптерной молекулы 1 (PRAM1), была показана их вовлеченность в ATRA-индуцированную дифференцировку клеток линии HL-60.

Теоретическая и практическая значимость работы

Для создания модельной схемы межмолекулярных взаимодействий, регулирующей процесс ATRA-индуцированной дифференцировки лейкозных клеток, успешно использована платформа, объединяющая методы исследования транскриптома и протеома с биоинформатическим алгоритмом. Подобная платформа может быть применена для исследования регуляции различных биологических процессов, для сравнения различных состояний биологических объектов на системном уровне и может использоваться для мониторинга ответа на действие лекарственных препаратов, для определения молекулярной гетерогенности опухолей и других целей персонифицированной терапии.

Диссертационная работа С.Е. Новиковой построена по классической схеме и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы,

Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы, который включает 169 источников, и Приложение. Диссертация изложена на 195 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 62 рисунка.

Во «Ведении» продемонстрирована актуальность темы исследования, степень ее проработанности, определены цели и задачи исследования, дается краткая характеристика работы (степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, степень достоверности и апробация результатов, а также положения, выносимые на защиту).

В разделе «Обзор литературы» изложены проблемы терапии ОПЛ, а также молекулярно-генетические характеристики, присущие данной опухоли и известные на сегодняшний день, приведены характеристики основных методов транскриптомного и протеомного анализа и описано их применение для изучения различных аспектов индуцированной дифференцировки клеток ОПЛ.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны протеомные (панорамная и таргетная масс-спектрометрия), транскриптомные (полногеномный транскриптомный анализ) и биоинформатические (поиск регуляторных молекул и построение модельной схемы дифференцировки) методы. На основании материала данного раздела можно заключить, что экспериментальная работа выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием современных аналитических и биоинформатических методов.

В разделе «Результаты» приведены основные результаты работы. Полученные полногеномные транскриптомные данные структурированы с использованием функциональной классификации. Количественные данные панорамной масс-спектрометрии приведены в виде тепловой карты. Результаты каждого этапа биоинформатического анализа приведены в

таблицах и в виде модельной схемы ATRA-индуцированной гранулоцитарной дифференцировки. Результаты целевого масс-спектрометрического анализа приведены в таблицах, отражающих относительное изменение белков в процессе дифференцировки, или их абсолютное содержание. Профили экспрессии PARP1, HIC1, LYN, FGR, VAV1, и PRAM1 на уровне мРНК и белка в процессе дифференцировки приведены в графической форме.

В разделе «Обсуждения» представлена интерпретация, полученных результатов, их сравнение с данными других авторов на похожие темы, приводятся биологические характеристики молекул, представляющих наибольший интерес на основании проведенного системного исследования.

В «Заключении» представлены резюме выполненного исследования и рекомендации по практическому применению результатов.

Выводы, представленные в конце диссертационной работы, полностью соответствуют полученным результатам экспериментов, четко сформулированы, отвечают поставленным задачам и положениям, выносимым на защиту. Перечень представленных выводов работы подтверждает, что автором диссертации решена важная научная проблема, связанная с применением системного подхода на базе современных транскриптомных, протеомных и биоинформативных технологий, для изучения молекулярных механизмов гранулоцитарной дифференцировки.

В «Приложении» приведены аннотированные спектры и результаты таргетного масс-спектрометрического анализа белков (для PARP1, HIC1, LYN, FGR, VAV1, PRAM1 и др.), калибровочные кривые для синтетических пептидных стандартов, используемых в работе.

Поставленные в диссертации задачи решены полностью.

По теме диссертации опубликовано 18 работ, из которых 14 статей в рецензируемых научных журналах и 4 публикации в трудах конференций.

Основные результаты работы полностью отражены в публикациях.

Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертации.

Вопросы и рекомендации

По работе имеется ряд вопросов и рекомендаций, которые, впрочем, не являются принципиальными и не влияют на положительное заключение по работе.

1. Эксперименты по ингибированию или, напротив, активации экспрессии элементов модельной схемы, позволили бы валидировать результаты биоинформатического предсказания. Планируются ли подобные эксперименты в будущем, и какие молекулы стоило бы проверить в первую очередь?
2. Известно, что МАРК киназы и транскрипционный фактор NF-κB участвуют в ответе клеток острого промиелоцитарного лейкоза на обработку полностью-транс-ретиноевой кислотой. Наблюдалось ли изменение экспрессии этих молекул на уровне мРНК и белка в данной работе?
3. Подписи к рисункам на страницах 81 и 94 диссертации, приведены на страницах 82 и 95, соответственно, что усложняет восприятие материала
4. В Таблице 2 автореферата названия столбцов приведены на английском языке. Эквивалентные русскоязычные термины были бы более уместны.

В заключение, нужно отметить, что диссертационная работа Новиковой Светланы Евгеньевны на тему: «Транскриптомика и протеомика индуцированной дифференцировки клеток линии HL-60» является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых

степеней» № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор заслуживает присуждения
искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 –
«Биохимия».

Оппонент



/Шевченко Валерий Евгеньевич/

ведущий научный
сотрудник лаборатории
онкопротеомики отдела
экспериментальной
биологии опухолей
НИИ канцерогенеза
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
доктор биологических наук,
профессор,

115478, г. Москва, Каширское шоссе д.24
федеральное государственное бюджетное
учреждение «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Тел.: +7(499)324-19-19
E-mail: kanc1@ronc.ru

Ученый секретарь ФГБУ
«НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, к.м.н.



М.П.



/Кубасова И.Ю./

«14» ноября 2017 г.