

ОТЗЫВ

**Официального оппонента Воробьева Ивана Ивановича
На диссертационную работу Ромашина Даниила Дмитриевича «Функции
мутантного p53 в кератиноцитах HaCaT», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия»**

Актуальность исследования. В диссертационной работе описывается нокаутирование обоих аллелей гена TP53, кодирующего белок p53 в линии кератиноцитов человека HaCaT, исследование свойств линии клеток с нокаутом TP53 и процесс трансдукции этих клеток лентивирусом, кодирующим дикий тип гена TP53. Белок p53 – это мастер-регулятор нескольких связанных между собой процессов: прохождения клеткой цикла, реакции на повреждения ДНК и прохождения апоптоза, при этом функции белка p53 в норме и при патологиях продолжают активно изучаться. Как указано в диссертации, именно в клетках эпидермиса активность p53 может отличаться от ситуации в других тканях и других типах опухолей, поскольку кожа постоянно подвергается облучению ультрафиолетовым излучением, что предполагает повышенный уровень активации процессов репарации ДНК и, соответственно, повышенный уровень активности p53 в норме. Таким образом диссертация Д.Д. Ромашина является актуальной как с фундаментальной, так и с биомедицинской точки зрения.

Структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 113 страницах, содержит 25 рисунков и 3 таблицы, построена по традиционному принципу, состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Список литературы включает 219 источников, в том числе статьи 2023 г. издания.

Характеристика диссертации.

В разделе «Обзор литературы» автор описывает особенности линии immortalized кератиноцитов HaCaT, помещая ее в контекст деления и дифференцировки клеток эпидермиса, и затем сравнивая линию HaCaT с первичными кератиноцитами человека. Затем автор рассматривает строение и функции гена TP53 и белка p53. После этого рассматриваются процессы эпителиально-мезенхимального перехода вообще и для клеток линии HaCaT. Обзор написан грамотным русским языком,

проиллюстрирован надлежащим образом, содержит ссылки на актуальные исследования в данной области и демонстрирует способности автора к поддержанию знаний о мировом уровне исследований кератиноцитов.

В разделе «Материалы и методы» диссертант корректно и достаточно подробно описывает использованные в работе методы, а именно CRISPR/Cas9 геномное редактирование, проточная цитометрия, иммуноблоттинг, транскрипционное профилирование и протеомный анализ, анализ скорости пролиферации и другие. Методы описаны так, что могут быть воспроизведены без дополнительных консультаций с автором. Их изложение показывает высокий экспериментальный уровень диссертанта и его достаточные знания методов исследования *in silico*.

Раздел Результаты представляет собой достаточно подробное и, что не менее важно, полностью логичное изложение проведенных экспериментов и планирование следующих шагов исследования на основании получаемых результатов. Вначале была получена линия HaCaT с инактивацией обоих аллелей TP53 и доказано отсутствие белка p53, затем автор провел анализ транскриптома и протеома полученной линии, а после этого провел более детальные исследования свойств созданных клеток и обнаружил ряд существенных изменений в их поведении и реакции на внешнее воздействие. Также автором было установлено, что полученные клетки высоко экспрессировали белок PD-1L, связанный с изменением иммунного окружения опухоли, что, на мой взгляд, является крайне важным результатом работы. Кроме того, в работе описывается изменение уровней экспрессии многих длинноцепочечных некодирующих РНК (lncRNA), что также может иметь значение для оценки поведения опухолевых клеток в процессе онкогенеза.

При попытке активации процесса эпителиально-мезенхимального перехода автором показано снижение уровня E-кадгерина и увеличение экспрессии N-кадгерина – маркеров эпителиального и мезенхимального фенотипа, соответственно, в полученных им клетках. В следующей части автор показывает, что нокаут p53 снижает скорость роста клеток, по сравнению с исходными клетками HaCaT. В завершающей части работы автор получил клетки с восстановлением гена TP53 дикого типа, но не сообщает результатов функциональных исследований данной линии.

В конце автор делает выводы, достаточно обоснованные полученными им результатами. Ключевые итоги исследования изложены в разделах «Заключение» и «Выводы».

Вопросы и замечания:

- 1) Нет сравнительного анализа для обнаруженных по RNASeq изменений в клетках HaCaT p53^{-/-} и изменений в других клетках при нокауте p53, насколько специфичны для HaCaT и вообще кератиноцитов найденные изменения в паттернах экспрессии генов?
- 2) Не совсем понятно, почему RNASeq анализ выполняли для клеток на экспоненциальной фазе роста, а анализ протеома – для субконфлюентных клеток и клеток на переходе к дифференцировке? Как можно соотнести результаты этих двух видов анализа состояния клетки?
- 3) Факт позитивной регуляции PD-L1 при нокауте TP53 в клетках HaCaT представляется весьма интересным и корректно доказанным. Есть ли данные об изменении уровней экспрессии B7 и других лигандов для рецепторов иммунной сверхточной точки для исследуемой клеточной линии?
- 4) Исследование обрывается на наиболее интригующем месте – после инактивации мутантного p53 в клетках HaCaT в них был введен интактный ген TP53, однако поведение таких клеток не описывается, можно только предположить, что они не потеряли свойств immortalized клеток. Может ли автор вкратце описать ожидаемые свойства таких клеток, какие признаки нормальных кератиноцитов будет, на его взгляд, восстановлены?
- 5) Стр. 55 Рис. 7А. Нет дорожки с нанесением половины количества контрольного образца, невозможно понять, как выглядела бы картинка для линии клеток с генотипом TP53^{+/+}?
- 6) Стр. 55 Рис. 7В. Как диссертант может описать появление трех аллелей TP53 в диплоидных клетках после редактирования? Один из трех аллелей соответствует inserции 18 п.о., с очень высокой вероятностью такая inserция приведет к

появлению полипептида p53 со вставкой 6 а.к., однако на блоттинге и ИФА такой белок не обнаруживается. Исходные клетки HaCaT содержат, по литературным данным, 2 разных аллеля p53 с мутациями H179Y и R282Q, какие аллели использовались как референсные при анализе с программой TIDE?

7) Стр 57, рис 8 – в клетках с генотипом TP53-/- уровень экспрессии TP53 при RNASeq определен как сниженный примерно в 8 раз, однако предполагается, что данный ген уже не кодирует функциональный белок. По какой причине он не был исключен из анализа дифференциальной экспрессии?

8) Стр. 81, рис.20 – различия в поведении клеток при индукции апоптоза карбонилцианид м-хлорфенилгидразоном очень сильны при концентрации агента 30 нМ и практически нивелируются при концентрации 50 нМ. А что будет происходить при концентрациях 10 нМ, 20 нМ, 40 нМ?

9) Стр. 88, рис. 23 – Для клеток WT наблюдается 2 полосы кератина 17, для клеток p53-/- - практически только нижняя полоса. Как диссертант может это объяснить?

Замечания, вопросы и комментарии к работе не влияют на общую высокую оценку и не умаляют значимость данной работы.

Диссертация Ромашина Даниила Дмитриевича «Функции мутантного p53 в кератиноцитах HaCaT» является цельной и законченной научно-квалификационной работой и имеет безусловную научно-практическую ценность. Диссертация Ромашина Даниила Дмитриевича полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Ромашин Даниил Дмитриевич, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской

академии наук». Ленинский пр-т., 33 стр.2, Москва, 119071. Email: ptichman@gmail.com,
телефон: +79166521478

Доктор биологических наук
(специальность 03.01.04. – биохимия)

Воробьев Иван Иванович

20. 11. 2024 г.

Подпись Воробьева И.И. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного учреждения «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской
академии наук», кандидат биологических наук.

Орловский Александр Федорович

