

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН ИМБ РАН д.б.н., акад. РАН,
Георгиева С.Г.



«20» ноября 2024 г.

Отзыв ведущей организации
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 темы исследования

Исследования в области биологии p53 остаются актуальными на протяжении нескольких десятилетий. Онкосупрессорные функции p53 активно исследуются с начала 90-х годов прошлого столетия. За это время было открыто множество механизмов, посредством которых p53 реализует свою главную биологическую функцию – сохранение геномного гомеостаза. Вместе с тем, обнаружение точечных мутаций в *TP53* стало важной отправной точкой для многих исследований. На сегодняшний день известно, что мутации в *TP53* встречаются в более, чем половине всех злокачественных опухолей, при этом мутантные формы p53 обладают выраженными онкогенными свойствами. Для многие мутации в *TP53* изучены в достаточной степени, другие – изучены фрагментарно, однако, исследование особенностей мутантных форм p53 может иметь высокое диагностическое и терапевтическое значение.

Диссертационная работа Ромашина Даниила Дмитриевича на тему «Функции мутантного p53 в кератиноцитах HaCaT» посвящена исследованию мутантного p53 в линии спонтанно-иммortalизованных кератиноцитов

HaCaT. Исследование особенностей данной мутантной формы актуально, так как мутации в геноме модельных клеток имеют схожий характер с мутациями, распространенными в эпидермисе человека, подвергнутого воздействию ультрафиолетового излучения.

Новизна исследования и полученных результатов

В рамках работы впервые был выполнен полный нокаут *TP53* в клетках линии HaCaT. Также впервые было выполнено молекулярное профилирование клеток HaCaT, дефицитных по p53. В частности, установлено, что инактивация p53 приводит к обогащению белков клеточной адгезии и фокальных контактов, Rab-ГТФаз, репрессии маркеров эпидермальной дифференцировки. Впервые было показано, что полная инактивация p53 приводит к усилению миграционной активности клеток HaCaT. Установлено, что мутантный p53 в клетках HaCaT ассоциирован с ингибированием химически-индуцированного апоптоза. Было установлено, что инактивация p53 в клетках HaCaT приводит к реализации эпителиально-мезенхимального перехода и активации экспрессии PD-L1. Таким образом в рамках работы впервые была дана комплексная функциональная характеристика мутантной формы p53 в кератиноцитах линии HaCaT.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Линия кератиноцитов HaCaT широко используется в качестве модели эпидермиса человека. Клетки HaCaT экспрессируют мутантную форму p53, особенности которой влияют на пролиферативную активность и реализацию программ клеточной гибели. Функциональная характеристика особенностей данной мутантной формы белка p53 позволит сформировать более глубокое представление об особенностях клеток HaCaT и ограничениях данной линии в качестве модели нормальных кератиноцитов. Вместе с тем, новые сведения о влиянии распространенных мутаций имеют значения для диагностики и терапии различных патологий кожи, включая онкологические заболевания.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании и выполнении всех экспериментальных работ. Результаты, представленные в диссертации, были получены либо автором, либо при его непосредственном участии.

Рекомендации по использованию результатов работы и выводов диссертации

Результаты работы и ключевые выводы имеют большое значение для исследовательской области, в частности, для исследований, направленных на изучение патологических процессов в коже, функций белков семейства p53, цитотоксических исследований. Описание методов, использованных в работе, может найти применение в транскриптомных и протеомных исследованиях, а также может быть использовано в образовательных целях.

Структура и оформление диссертации

Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста и содержит 25 рисунков и 3 таблицы. Диссертация имеет традиционную структуру и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы.

Введение отражает актуальность и значимость исследования. В данном разделе формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, а также приводит сведения об апробации полученных результатов и их достоверности.

В обзоре литературы систематизирована информация о белке p53 и его гомологах, его биологической роли в норме и при патологиях, особенностях его мутантных форм.

Раздел материалы и методы включает корректное и подробное описание использованных методов, включая нокаут *TP53* с использованием системы CRISPR/Cas9, транскриптомный и протеомный анализ, проточную цитометрию и другие методы. Раздел также содержит информацию о методах статистической обработки результатов.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор последовательно приводит результаты работы. Раздел начинается с комплексной верификации нокаута *TP53* в HaCaT, после чего следует описание основных результатов транскриптомного и протеомного анализа. Автор подробно описывает наиболее значимые результаты и сопоставляет их с актуальными литературными данными.

Ключевые результаты исследования кратко изложены в разделе «Заключение», после которого следуют корректно сформулированные выводы.

Содержание диссертации изложено логично и грамотно, выводы соответствуют поставленным задачам. Диссертационное исследование выполнено на высоком уровне с использованием современных методов биохимии, биоинформатики и молекулярной биологии.

Замечания и вопросы по диссертационной работе

Часть, описывающая личный вклад автора, не содержит информации о коллегах, которые биоинформатически обрабатывали данные транскриптомов.

В литобзоре, который написан полно и исчерпывающе, хорошо было бы дать больше иллюстраций и таблиц, систематизирующих информацию о функциях p53. Например, проиллюстрировать сигнальные каскады, которые приводят к активации p53 и механизмы апоптоза, которые p53 запускает сам. В таблице можно было бы систематизировать информацию про мутации p53 и их влияние на клетки.

Представляется странным выбор контроля для изучения функций мутаций p53 – полный нокаут *TP53*. Обычно сравнивают норму и какое-то нарушение. В данном случае при чтении работы сложно понять, что такое «норма», так как нокаут тоже приводит к изменению свойств и функций HaCaT.

В работе подробно разбираются результаты полногеномных экспериментов по секвенированию РНК при экспрессии мутантных форм p53 и при нокауте. Рассматриваются изменения экспрессии важных эффекторных генов согласно РНК-сиквенсам. Однако для добавления значимости выводам результаты полногеномных сиквенсов обычно валидируются количественной ПЦР. В работе это не было сделано.

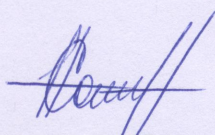
Мелкие замечания: в работе присутствуют опечатки, как, например, INF- γ в некоторых предложениях написан как IFNy, что создает путаницу. А также в некоторых местах указан H2A, гистон вместо варианта γ -H2A.X.

Заключение

Диссертация Ромашина Даниила Дмитриевича на соискание ученой степени кандидата биологических наук по теме «Функции мутантного p53 в кератиноцитах HaCaT» является завершенной научно-квалификационной работой. Диссертация соответствует требованиям пп. 9 – 14, определенным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 (в ред. От 25.01.2024) «О порядке присуждения ученых степеней». Автор диссертации заслуживает присуждения степени кандидата наук по специальности 1.5.4. – биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре ФГБУН ИМБ РАН, от 21 октября 2024 года.

Отзыв составил старший научный сотрудник
Лаборатории факторов транскрипции ФГБУН ИМБ РАН,
к. б. н.


Сошникова Наталия Валерьевна

Подпись Н.В. Сошниковой заверяю:
Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН
к. ф.-м. н.



Коновалова Елизавета Владимировна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук (ИМБ РАН)

Адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН

Тел.: 8(499)135-23-11, 8(499)135-11-60

Электронная почта: isinfo@eimb.ru

Официальный сайт: <http://eimb.ru>