

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Кима Яна Сергеевича  
**«Функциональная и фенотипическая характеристика популяций опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии маркера стволовых клеток CD133»,**  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.4. – «Биохимия»

При исследовании молекулярных и клеточных механизмов, регулирующих рост и диссеминацию злокачественных опухолей, большое внимание уделяется гетерогенности опухолей и, в частности, наличию в них опухолевых стволовых клеток (ОСК) или, если речь идет о карциномах, раковых стволовых клеток (РСК). Проблемой, встающей перед исследователями, является недостаточная охарактеризованность маркеров ОСК. При анализе существующей литературы зачастую возникают значительные трудности из-за того, что в разных опухолях или линиях опухолевых клеток стволовые клетки определяются на основании различных маркеров. Сведения о наличии этих маркеров также очень противоречивы, что возможно объясняется различиями в использованных методах детекции. Поэтому анализ большого количества линий опухолевых клеток и опухолевого материала на наличие одного из основных маркеров ОСК CD133, выполненный одним методом и верифицированный другими методами, которые дают представление о наличии CD133-положительных клеток в этих клеточных линиях, а также в первичных линиях, полученных из опухолей, в сочетании с последующей характеристикой CD133-положительных клеток, а также поиск регуляторов экспрессии CD133 является очень актуальным. Решению этих вопросов и посвящена работа Я.С. Кима.

Для решения поставленных задач авторы использовали целый арсенал современных биологических подходов – помимо классического культивирования клеточных линий, они использовали проточную цитометрию и сортировку клеток, проточную цитометрию с визуализацией, иммунофлуоресцентную микроскопию, клоногенные тесты для оценки пролиферативной и клоногенной активности выделенных клеток, ПЦР, сравнительный протеомный анализ клеточных популяций. Анализ регуляторных функций транскрипционного фактора TRIM28 проводили с помощью нокдауна гена лентивирусной трансдукцией shRNA или

редактированием генома нокаятом CRISPR/CAS9. Все эти методы сочетались с проведением биоинформационного анализа дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков и поиском ключевых молекулярных регуляторов CD133.

Авторы выполнили с помощью цитометрии анализ содержания CD133-положительных клеток в 21 линии опухолевых клеток, которые широко используются в лабораторных исследованиях, а так же подтвердили правильность своего определения с помощью другого метода – флуоресцентного окрашивания CD133 в клеточных линиях A549 и H460, про которые в научной литературе опубликованы очень противоречивые результаты. Было показано, что в большинстве исследуемых линий CD133-положительные клетки отсутствуют. На основании проведенного анализа для дальнейших исследований были выбраны три клеточные линии, Caco2, HT-29 и HUH7, демонстрирующие высокое содержание CD133-положительных клеток. Было показано, что экспрессия CD133 ассоциирована с повышенной пролиферативной и клоногенной активностью. С использованием ДНК-микрочипов и масс-спектрометрии высокого разрешения был выполнен тщательный анализ дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков в клеточных популяциях  $CD133^{+/high}$  и  $CD133^{-/low}$  в линиях Caco2, HT-29 и HUH7, который не показал наличия изменения экспрессии каких-либо белков, общих для всех линий. С помощью дополнительного *in silico* анализа были выявлены 16 потенциальных регуляторов экспрессии CD133 и из них на основе оценки частоты встречаемости среди возможных регуляторов, обеспечивающих обнаруженную дифференциальную экспрессию белков в исследованных  $CD133^{+/high}$  и  $CD133^{-/low}$  клетках, наивысший рейтинг получил транскрипционный фактор TRIM28. Авторы работы показали, что CRISPR/CAS9 нокаят TRIM28 приводит к статистически значимому снижению экспрессии CD133, т.е. определили TRIM28 как молекулу, регулирующую уровень экспрессии CD133. Результаты, представленные в автореферате, подтверждены иллюстрациями высокого качества.

К сожалению, в автореферате не приведена даже краткая характеристика TRIM28 или данные о том, что известно о его функциях и не сделано никакого заключения.

Выводы диссертации хорошо сформулированы и обоснованы. Данные, полученные в результате выполнения этой работы, были опубликованы в 10 рецензируемых журналах рекомендованных перечнем ВАК РФ и доложены на 4 крупных конференциях.

Таким образом, можно заключить, что работа Кима Я.С. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления от 01.10.2018 года с изменениями от 20.03.2021 №426). Уровень и качество исследований, представленных в диссертации и автореферате Кима Я.С. показывают, что автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

20 января 2023

д.б.н., вед. научн. сотр. лаборатории механизмов канцерогенеза  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
E-mail: [a.alexandrova@ronc.ru](mailto:a.alexandrova@ronc.ru)

Антонина Юрьевна Александрова

Подпись Александровой А.Ю. заверяю

Ученый секретарь НИИ канцерогенеза  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России  
канд. биол. наук.



Маргарита Владимировна Гудкова

115478 г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

<https://www.ronc.ru>

Тел.: +7 (499) 324-29-44