

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор ИБР РАН

член-корреспондент РАН, д.б.н.

А.В. Васильев

«23» января 2023

## **ОТЗЫВ**

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН) на диссертацию Кима Яна Сергеевича «Функциональная и фенотипическая характеристика популяций опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии маркера стволовых клеток CD133» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

**Актуальность исследования.** Диссертационная работа Кима Я.С. посвящена исследованию корреляции уровня экспрессии маркера стволовых раковых клеток CD133 и морфофункциональных особенностей клеток опухолевых линий с разным уровнем экспрессии этого маркера. Данная проблема лежит в русле исследования популяции раковых стволовых клеток (РКС) как возможной мишени противоопухолевой терапии, а также позволяет проводить поиск новых молекулярных механизмов, задействованных в реализации пластичности и гетерогенности клеток опухолей, а также их способности к воспроизведению после абляции химиотерапией. Концепция иерархической структуры популяции опухолевых клеток с наличием субпопуляции стволовых до конца не определена. Кроме того, функции CD133 и его участие в сигнальных каскадах, регулирующих пролиферацию и метастатический потенциал раковых клеток, а также нормальных стволовых клеток, остаются мало изученными. Таким образом, актуальность работы Яна Сергеевича Кима не вызывает сомнений.

## **Структура и содержание, научная новизна.**

Диссертационная работа Кима Яна Сергеевича имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов, обсуждения результатов, заключения и приложения. Диссертация изложена на 101 странице и включает 19 рисунков, 2 таблицы и 7 элементов приложения.

Во Введении автор работы кратко описывает актуальность темы исследования, формулирует цели и задачи исследования, подчеркивает научную новизну и практическую значимость исследования, описывает степень достоверности полученных результатов и указывает на то, как проходила апробация работы. Целью работы является характеристика функциональных и фенотипических особенностей опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии CD133 и выявление молекулярных регуляторов CD133.

Обзор литературы посвящен развитию и формированию теории РСК, которая пытается описать причины и процесс формирования клеточной гетерогенности опухолей. Автор демонстрирует преемственность современной теории РСК ранним работам XX века, посвященным изучению клеточных аспектов опухолей, акцентирует внимание на кристаллизации теории РСК в работах Бонэ и Дика, а также описывает реформирование теории РСК в свете современных достижений науки. Также автор приводит исследования, которые представляют CD133 в качестве одного из наиболее часто используемых для изучения популяции РСК маркеров, обсуждает наиболее известные молекулярные партнеры CD133, а также приводит гипотезы о его возможной биологической функции.

В разделе Материалы и методы исследования автор подробно и четко описывает экспериментальные подходы, использованные в работе. Помимо уже классических методов анализа, таких как проточная цитометрия, ПЦР в реальном времени и флуоресцентная микроскопия, автор использует современные методические подходы, такие как проточная цитометрия с визуализацией, а также метод геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9 системы.

В следующем разделе автор работы детально и последовательно приводит следующие результаты исследования.

- Автор показывает, что CD133 является наиболее часто используемым маркером для выделения и изучения популяции РСК в работах, верифицирующих их функциональные свойства с помощью мышей с иммунодефицитом. Также автор работы показывает, что наиболее часто CD133 используют для изучения популяции РСК в опухолях эпителиальной природы.

- Автор демонстрирует, что экспрессия CD133 в стабильных опухолевых линиях не носит повсеместный характер: лишь в 4 клеточных линиях из 21 автор демонстрирует наличие популяции клеток с экспрессией мембранныго CD133. Из них он выбирает три для дальнейшего более глубокого изучения.

- С помощью функциональных текстов автор показывает, что клетки с более высокой экспрессией CD133 демонстрируют большую пролиферативную активность во всех трех выбранных клеточных линиях – Caco2, НТ-29 и НУН7. Причем автор работы показывает, что в линиях Caco2 и НТ-29 экспрессия CD133 также напрямую коррелирует с клоногенной активностью клеток.

- Автор находит дифференциально экспрессируемые в клеточных популяциях с различным уровнем CD133 транскрипты и белки, чья экспрессия в популяциях отличается не менее чем в два раза.

- С использованием списков дифференциально экспрессируемых транскриптов и белков автор работы находит и ранжирует 16 потенциальных молекулярных регулятора CD133.

- Далее автор работы показывает, что полный нокаут, но не частичный нокдаун, наиболее перспективного белка TRIM28 значимо снижает уровень экспрессии CD133 в клетках Caco2.

В разделе Обсуждение представлены в кратком виде результаты и соображения автора по поводу полученных результатов. Полученные выводы полностью удовлетворяют поставленной цели исследования и задачам.

Результаты работы представлены в 14 научных работах, 10 из которых являются публикациями в рецензируемых научных журналах, а 4 публикации в

трудах конференций. Содержание опубликованных автором оригинальных работ полностью отражает основные положения диссертационной работы Кима Яна Сергеевича.

Новизна исследования заключается в том, что впервые проведен систематический анализ широкого спектра опухолевых линий и продемонстрирована их гетерогенность по наличию экспрессии CD133, показано, что экспрессия CD133 напрямую коррелирует с пролиферативными и клоногенными свойствами клеток в опухолевых линиях, впервые установлено, что транскрипционный фактор TRIM28 может быть молекулярным регулятором экспрессии CD133, а его полный нокаут приводит к подавлению экспрессии CD133 в клетках колоректального рака. Следует также отметить получение с помощью метода геномного редактирования CRISPR/Cas9 панели клонов линии Caco2 с полным нокаутом TRIM28. В ходе работы был также разработан ряд оригинальных методик и методических подходов.

Работа Кима Я.С. представляет большой интерес для исследователей биологии стволовых клеток, онкогенеза и терапии опухолей. Полученные клеточные линии будут востребованы для широкого круга работ различных научных организаций, занимающихся изучением биологии опухолевой клетки (ИБХ РАН, ИМБ РАН, Биологический факультет МГУ и др.). Разработанные методические приемы, в том числе с использование цитометрии с визуализацией пригодятся в дальнейшем для решения экспериментальных задач.

В диссертационной работе Кима Я.С. использованы современные методы экспериментальной биологии и биоинформационической обработки данных, проанализировано достаточное количество образцов, проведен грамотный статистический анализ. Обоснованность и достоверность выводов обеспечивают независимые повторы экспериментов и наличие адекватных контролей, а также проведенный анализ полученных экспериментальных данных. Все выводы следуют из результатов работы и содержат ответ на поставленные в диссертации задачи.

**Замечания.** По диссертационной работе Кима Я.С. имеются следующие вопросы и замечания:

- 1) Почему в качестве генов маркеров нормальных стволовых клеток при анализе в популяциях CD133+/high и CD133-/low методом ПЦР в реальном времени были выбраны в основном гены плюрипотентных клеток, а не маркеры соответствующих тканеспецифических стволовых клеток? Этот вопрос также связан с некоторым смешением понятий в обзоре литературы – происхождение раковых опухолей из стволовых клеток подразумевает, прежде всего, трансформацию тканеспецифичных стволовых клеток, а происходящие из плюрипотентных стволовых клеток (в том числе, герминальных) тератомы и тератокарциномы все же относятся к несколько иному типу опухолей.
- 2) Нокаут TRIM28 анализировали с помощью вестерн blotting. Однако, строго говоря, этот метод не позволяет с уверенностью говорить о нокауте гена, а лишь указывает на отсутствие белка в результате манипуляций, что, теоретически, может быть побочным продуктом, например, нокаута другого гена.
- 3) В разделе Обсуждение в значительной мере приводится краткое изложение результатов, что в некоторой мере снижает ценность этого раздела.
- 4) Имеются неудачные выражения и жаргонизмы («картинка» вместо «рисунок», «эксклюзия» вместо «выброса», «супервизия» вместо «руководство»).

Высказанные замечания не снижают общей оценки работы.

## Заключение

Диссертация Кима Яна Сергеевича «Функциональная и фенотипическая характеристика популяций опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии маркера стволовых клеток CD133» является законченной научно-

квалификационной работой, имеющей существенное научное и практическое значение для изучения клеточной гетерогенности опухолей человека.

Таким образом, можно заключить, что работа Кима Яна Сергеевича по своей актуальности и новизне соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановления № от 01.10.2018 г., с изменениями № 426 от 20.03.2021 г.), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук. Объем 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.

Отзыв на диссертацию Кима Яна Сергеевича обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (протокол №1 от 17.01.1023 г.).

Заведующий

лабораторией клеточной биологии ИБР РАН,

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Воротеляк Екатерина Андреевна

Подпись д.б.н, чл.-корр. РАН Воротеляк Екатерины Андреевны «заверяю»

Ученый секретарь

ИБР РАН,

кандидат биологических наук

Хабарова М.Ю.

119334, Москва, ул. Вавилова, 26, ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

email: [info@idbras.ru](mailto:info@idbras.ru), тел. +7 (499) 135-33-22