

ОТЗЫВ

**Официального оппонента Татарского Виктора Вячеславовича
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. Диссертация посвящена роли мутации гена TP53 в линии кератиноцитов, и влияние мутантного белка на пролиферацию, дифференцировку и иммунную супрессию кератиноцитов. TP53 является важнейшим опухолевым супрессором, мутированным в половине опухолей человека, и влияющем на огромное количество процессов в клетке. Тем не менее его новые функции продолжают изучаться, и применение новых методов, таких как полногеномные исследования и протеомика позволяют выявить ранее малоизученные функции. Таким образом диссертация Д.Д. Ромашина является актуальной как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 113 страницах и содержит 25 рисунков и 3 таблицы и построена по традиционному принципу, включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Список литературы включает 219 источников, включая самые современные публикации.

Характеристика диссертации.

В разделе «Обзор литературы» автор описывает особенности линии нормальных кератиноцитов HaCaT, начиная обзор с рассмотрения строения и дифференцировки нормального эпидермиса, и затем сравнивая линию HaCaT с первичными кератиноцитами. Во втором разделе автор рассматривает строение и функции гена и белка p53, особое внимание уделяя роли некодирующих РНК в регуляции p53 и зависимых от него генов. В последней части раздела автор рассматривает процесс эпителиально-мезенхимального перехода в клетках HaCaT. Обзор написан литературным русским языком, и хорошо проиллюстрирован, включает ссылки на новейшие статьи по теме и показывает хорошее знание литературы по теме диссертации.

В разделе «Материалы и методы» диссертант подробно описывает использованные в работе методы: CRISPR/Cas9 геномное редактирование, проточная цитометрия, иммуноблоттинг, транскрипционное профилирование и протеомный анализ, анализ скорости пролиферации и другие. Методы описаны достаточно подробно, для независимого воспроизведения, произведенных экспериментов и показывают высокий экспериментальный уровень диссертанта.

Затем автор представляет результаты своего исследования. Вначале автор получил изогенную линию с нокаутом TP53 с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 и доказал отсутствие целевого белка в полученной линии. Затем автор сравнил транскрипционный профиль нокаутных клеток и исходных клеток дикого типа. Автор показывает нарушения в эпидермальной дифференцировке, клеточного цикла, иммунного ответа и других процессов. Среди особенно интересных измененных генов, стоит отметить увеличение экспрессии PD-L1 – важной мишени для иммунотерапии. То, что нокаут p53 способствует изменению белков связанных с изменением иммунного окружения опухоли является важным результатом работы. Также автор показывает увеличение экспрессии генов, связанных с такими важными про-онкогенными путями, как MAPK, PI3K/AKT и NF- κ B. Особенно интересным является анализ изменений в экспрессии длинноцепочечных РНК (lncRNA), показавший изменения 118 генов, кодирующих такие транскрипты. Для многих из этих транскриптов описаны про-онкогенные и опухоль-супрессирующие свойства, однако свойства многих lncRNA были ранее не описаны. Функции lncRNA были сходны с процессами, контролируруемыми генами, идентифицированными в ходе транскрипционного анализа, и включали метастазирование и инвазию, пролиферацию и воспалительный ответ.

Затем автором был проведен сравнение уровня белков между двумя линиями с помощью протеомного анализа в условиях суб-конфлюентной плотности и при дифференцировке в 100% конфлюентности. Данный анализ показал, что 511 из 2644 идентифицированных белков дифференциально экспрессировались между линиями, с основными затронутыми процессами – трансляцией и адгезией.

В следующей части работы автор верифицировал полученные в омиксных исследованиях данные. Так, для верификации активации процесса эпителиально-

мезенхимального перехода автором показано снижение уровня Е-кадгерина и увеличение экспрессии N-кадгерина – маркеров эпителиального и мезенхимального фенотипа, соответственно. Также в этом разделе автор подтверждает увеличение уровня PD-L1, который также участвует в ЭМП переходе. Автор показывает, что эти изменения имеют функциональное значение на такой процесс как миграции клеток, в тесте на застывание раны.

В следующей части автор показывает что нокаут p53 снижает скорость роста клеток, по сравнению с исходными клетками с мутантным p53^{R282Q/H179Y}. Затем автор показывает ингибирование программы эпидермальной дифференцировки по маркерным генам и распределению кератинов, что также подтверждает ранее полученные омиксные данные. При этом нокаут P53 усиливал апоптоз индуцированный карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (CCCP) и CdCl₂. При этом уровень кератина-17 в нокаутах был увеличен при действии CdCl₂. Уровень генотоксического стресса был также увеличен в клетках с нокаутом P53, как на базальном уровне, так и при действии CdCl₂. В последней части работы автор реинтродуцировал p53 дикого типа, однако не проводил дальнейших функциональных исследований данной линии.

В конце автор делает конкретные выводы, которые являются логичными и обоснованными и вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Ключевые итоги исследования изложены в разделах «Заключение» и «Выводы».

К работе имеется ряд вопросов и замечания:

1. Транскрипционные и протеомные исследования сделаны при базальном уровне p53, однако, известно, что посттрансляционные модификации этого белка при его активации значительно меняют его функцию. В будущих исследованиях целесообразно посмотреть p53 зависимые процессы, при ДНК-повреждениях и других процессах, активирующих p53
2. Интересно насколько велико было пересечение генов, экспрессия которых достоверно менялась в транскрипционном анализе и белков, идентифицированных в протеомном анализе?
3. Т.к. сравнение нокаута p53 производится с мутантным p53^{R282Q/H179Y} в клетках HaCaT имеет смысл везде указывать что сравнение нокаута производится с

таким мутантом. Также следует с осторожностью говорить о том, что мутант обладает определенными свойствами, т.к. такой белок не сравнивался с белком дикого типа. Автор реинтродуцировал белок дикого типа для сравнения с мутантным белком, и сравнение этих линий будет очень интересным исследованием.

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на высокую оценку данной работы.

Таким образом, диссертация Ромашина Даниила Дмитриевича «Функции мутантного р53 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:

Старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук. ул. Вавилова, 34/5, Москва, 119334. Email: tatarskii@gmail.com, телефон: +79165535786

Кандидат биологических наук

(специальность 14.01.12 – онкология)

В.В.

Татарский Виктор Вячеславович

15.11.2024г.

Подпись Татарского В.В. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук, доктор биологических наук.



Набирочкина Елена Николаевна