

ОТЗЫВ

**официального оппонента Замятина Андрея Александровича
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических
наук Ломова Николая Андреевича на тему: «Изучение механизмов
образования транслокаций, ассоциированных со вторичными
лейкозами, вызванными терапией ингибиторами ДНК-топоизомераз II»
по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»**

Диссертация Николая Андреевича Ломова посвящена изучению механизма образования хромосомных перестроек, которые сопровождают вторичные лейкозы, вызванные предшествующей терапией. Эти лейкозы характеризуются острым течением заболевания, а также крайне неблагоприятным прогнозом. От этого побочного эффекта химиотерапии страдает до 6% пациентов. Опосредованный терапией острый миелоидный лейкоз возникает после терапии ингибиторами ДНК-топоизомераз 2 типа. На сегодня это наиболее часто применяемые химиотерапевтические препараты, поэтому проблема действительно актуальна. Следствием действия топоизомеразных ингибиторов являются хромосомные перестройки в первую очередь генов *AML1* и *MLL*, которые перестраиваются с одним из своих партнеров по транслокации. Эти транслокации приводят к образованию химерных генов, которые обладают онкогенным действием.

Работа Николая Андреевича Ломова направлена на выявление механизмов, которые определяют хромосомные транслокации, связанные со вторичными лейкозами. Эти перестройки возникают при действии ингибиторов ДНК-топоизомераз 2 типа. Изучение механизмов образования хромосомных транслокаций привело исследователей к выявлению двух основных факторов, определяющих транслокации. Первый фактор — пространственная близость генов-партнеров по перестройкам. Второй фактор — приобретение повышенной подвижности локусов хроматина после образования в них двуцепочечного разрыва ДНК. В разных случаях роль этих

факторов увеличивается или уменьшается. В диссертационной работе Николая Андреевича изучались оба этих фактора применительно к транслокациям, образующимся при вторичном лейкозе. Методами FISH и 4C были проанализированы пространственная подвижность перестраивающихся генов и их контакты с генами-партнерами. Было показано, что образующиеся в результате действия ингибитора ДНК-топоизомеразы разрывы гена *AML1* имеют более высокую подвижность в ядре относительно границ своих хромосомных территорий, что согласуется с полученными в лаборатории ранее данными для гена *MLL*. В то же время 4C-анализ спектра контактов генов *AML1* и *MLL* не выявил предрасположенности между генами-партнерами по транслокациям. Из полученных результатов автор работы делает вывод, что для перестроек при вторичных лейкозах определяющим фактором является повышенная подвижность разорванных генов.

Однако данная работа не ограничилась лишь изучением механизмов образования транслокаций. Были предприняты практические шаги в направлении решения проблем вторичных лейкозов. Так, была создана специальная клеточная модель, на которой можно изучать влияние различных соединений на вероятность образования транслокации *AML1-ETO*. В качестве доказательства способности (proof of concept) модели выступать тест-системой для оценки вероятности формирования перестроек можно считать результат действия ингибитора белка репарации разрывов ДНК NU7026, который выражался в увеличении числа транслокаций. Далее с помощью этой тест-системы были проверены препараты, часто применяемые в современной химиотерапии в комбинации с топоизомеразными ингибиторами. Было показано, что один из препаратов — метотрексат — повышает вероятность формирования транслокации *AML1-ETO*. Эти данные, при условии проведения дополнительных исследований, могут повлечь за собой конкретный практический результат — изменения в рекомендациях по применению метотрексата в терапии опухолей и аутоиммунных заболеваний. Наконец, с помощью данной клеточной модели можно проводить скрининг

библиотек химических соединений на предмет снижения числа транслокаций при совместной терапии с ингибиторами топоизомераз.

Сама диссертация имеет традиционную структуру. Она изложена на 142 страницах, из которых 25 страниц занимает список литературы, всего в котором содержится 391 публикация. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка публикаций Николая Андреевича по теме работы и списка цитированной литературы. Диссертация хорошо проиллюстрирована — всего она содержит 38 рисунков, написана понятным языком, а также отличается аккуратной версткой.

Во введении описаны актуальность работы и степень разработанности темы, сформулированы цели и задачи исследования, определена научная новизна и научная значимость, описаны личный вклад автора, методология и методы исследования, в также сформулированы положения, выносимые на защиту. Завершается «Введение» списком опубликованных по результатам работы статей, патента и списком научных конференций, на которых были представлены результаты. Всего было опубликовано 7 статей, из которых три являются обзорами, две экспериментальные статьи посвящены разработанному методу и две экспериментальные статьи описывают научные результаты, полученные в рамках диссертационной работы. Также имеется патент на изобретение. В шести статьях из семи, а также в патенте, Николай Андреевич является первым автором.

Обзор литературы состоит из шести глав, описывающих различные аспекты диссертационной работы. Первый раздел содержит общую информацию о лейкозах и их цитогенетических маркерах — хромосомных транслокациях, а также описывает феномен вторичных лейкозов, вызванных предшествующей химиотерапией. Второй раздел посвящен механизмам развития лейкоза при перестройках генов *AML1* и *MLL*. Описаны функции генов *AML1* и *MLL* в организме, а также строение и принципы работы нормальных белков AML1 и MLL, что объясняет молекулярные механизмы

развития лейкоза при экспрессии AML1- и MLL-слитых белков. В третьем разделе обзора обсуждаются топоизомеразные яды и механизм их действия. Рассмотрены принципы функционирования ДНК-топоизомераз II, их значение для делящихся клеток, а также опасность, заключенная в работе этих ферментов для клеток. Описаны молекулярные механизмы действия топоизомеразных ядов и пути процессинга ковалентных комплексов субъединиц топоизомеразы с концами ДНК. Механизмы репарации двуцепочечных разрывов ДНК в клетке описаны в четвертом разделе. Там же описаны механизмы, влияющие на выбор того или иного пути репарации разрывов. Пятый раздел посвящен факторам, определяющим образование тех или иных транслокаций. Этот раздел по способу изложения материала несколько отличается от других, однако наиболее подходит под определение обзора литературных источников. В нем обсуждаются работы по изучению механизмов транслокаций: описаны основные эксперименты, результаты и выводы из них; работы сгруппированы согласно общей логике раздела. Шестой раздел посвящен технологиям редактирования генома.

Обзор литературы написан понятно и профессионально, в нем цитируются современные статьи, большое количество (65 штук) из которых опубликовано в последние 5 лет. Информация из цитируемых статей проработана, сделаны необходимые обобщения и заключения, выстроена понятная логика повествования. Многие схемы и рисунки сделаны автором, а не просто взяты из обзореваемых статей. Можно подытожить, что обзор литературы в диссертации Николая Андреевича Ломова сам по себе является самостоятельным исследованием.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание методов, используемых в работе. Раздел написан достаточно живым языком, отличающегося от кратких протоколов тем, что в нем объясняется смысл многих этапов проводимых процедур. В разделе также присутствуют иллюстрации, что облегчает восприятие материала. Раздел довольно

обширный — 27 страниц, что связано с широким спектром методов, которые применялись в исследовании.

В разделе «Результаты» автор сначала описывает результаты, полученные в его лаборатории ранее, так как это позволяет понять логику некоторых экспериментов, проводимых в рамках диссертационной работы. Так, методом FISH была показана повышенная подвижность гена *MLL*, которую он приобретает при обработке клеток этопозидом. Поэтому в работе Николая Андреевича методом FISH был исследован второй ген, часто перестраивающийся при вторичном лейкозе — *AML1*. Методика проведения FISH была усовершенствована — использовалось не два, а три цвета: для визуализации хромосомной территории и двух половинок гена *AML1*. Также была доработана специальная компьютерная программа для анализа результатов FISH по снимкам с микроскопа. Это позволило одновременно наблюдать за тем, целый ген или разорванный, и где он при этом находится относительно границы своей хромосомной территории, а также проанализировать большой массив данных для получения статистически значимых результатов. Проведенные эксперименты показали, что разорванные под действием этопозида аллели *AML1* гораздо чаще локализуются вне своей хромосомной территории по сравнению с интактными аллелями.

Далее был проведен 4C-анализ для изучения спектра контактов генов *AML1* и *MLL*. Можно было ожидать, что, если перестройки определяются пространственным расположением генов, значит они чаще контактируют между собой. Однако частота контактов генов-партнеров не превышала частоту контактов *AML1* и *MLL* с другими локусами генома, что говорит об отсутствии пространственной предрасположенности генов в изучаемых перестройках.

Дальнейшее изучение механизмов образования хромосомных перестроек, ассоциированных со вторичными лейкозами, требовало уже новых подходов. Таким подходом в работе Николая Андреевича стало

использование специально созданной клеточной модели. В ней по сигналу экспериментатора формируются транслокации *AML1-ETO* во многих клетках культуры. Доля таких клеток может быть определена с помощью количественной ПЦР, детектирующей перестройку. А воздействие на культуру различными соединениями, такими как ингибиторы белков репарации, может приводить к повышению или понижению частоты транслокации.

В диссертации подробно описана логика создания такой модели. Идея заключается в интеграции в геном клеток конструкций, содержащих ген нуклеазы Cas9, который контролируется индуцируемым промотором, а также генов РНК-гидов, направляющих нуклеазу на локусы, между которыми возникает перестройка. Стоит отметить, что в процессе получения таких клеток был разработан удобный протокол для проверки эффективности любых программируемых нуклеаз. Этот протокол надежнее метода с использованием T7-эндонуклеазы, значительно дешевле и быстрее методов с использованием секвенирования. Его применение имеет большое практическое значение ввиду повсеместного распространения технологий редактирования генома.

Полученная культура клеток была охарактеризована: изучена кинетика экспрессии нуклеазы после индукции и кинетика накопления транслокаций. Для точного определения числа транслокаций были разработаны соответствующие протоколы. Затем были проведены эксперименты по влиянию ингибиторов некоторых белков репарации на число транслокаций. Из другой работы автора было уже известно, что NU7026, ингибитор DNA-RKcs, белка репарации разрывов по пути негомологичного соединения концов, повышает вероятность образования транслокации *IGH-MYC*. Поэтому этим ингибитором проверяли модель как тест-систему для оценки вероятности образования транслокации *AML1-ETO*. Было показано, что модель *AML1-ETO* действительно отвечает на обработку этим ингибитором повышением числа транслокаций.

С помощью полученной модели были проведены опыты с различными препаратами, которые используются в химиотерапии совместно с ингибиторами топоизомераз. Было проанализировано 8 препаратов из разных классов по механизму действия. Препараты были подобраны специалистами из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Было показано, что ингибитор дигидрофолатредуктазы метотрексат приводит к повышению числа транслокаций в клеточной культуре.

В обсуждении результатов проводится обобщение полученных данных, их обсуждение и концептуализация в контексте результатов других работ по теме. На основе данных литературы и полученных результатов делается вывод, что транслокации, возникающие под действием топоизомеразных ядов, определяются свойствами разрывов: такие разрывы сложны в репарации, так как представляют собой ковалентные комплексы конца ДНК и субъединицы топоизомеразы. Сложность репарации повышает время существования таких разрывов и их путь диффузии в ядре. Это приводит к тому, что исходное взаимное расположение в ядре генов-партнеров не имеет значения. Таким образом, делается вывод, что для изучаемых транслокаций определяющим фактором является именно подвижность разорванных генов. В этом разделе диссертации также обсуждаются и результаты, полученные с помощью клеточной модели. Они подтверждают идею о том, что если концы разрывов не удерживаются вместе, это повышает вероятность образования транслокаций. Также упоминается возможность применения полученной клеточной модели в качестве тест-системы для поиска соединений, способных уменьшить число транслокаций. Их использование в терапии могло бы снизить число вторичных лейкозов.

Заключение диссертации представляет из себя обобщение выводов, сделанных в работе, и резюме их обсуждения. Сами выводы сформулированы традиционным списком из небольших и емких тезисов. Выводы соответствуют достигнутым результатам.

Диссертационная работа Н.А. Ломова не вызывает существенных замечаний. Однако следует отметить некоторые моменты:

Обзор литературы

- Как мне кажется, автор мог бы уделить несколько больше внимания актуальности проблемы, приведя данные о заболеваемости лейкозами в России и в мире;

- Отсутствует раздел, связующий Литературный обзор с остальной диссертацией.

Материалы и методы

- Глава «Материалы» в разделе отсутствует. Информация об источниках получения и фирмах-производителях для штаммов, клеточных линий, материалов и реагентов, использованных при выполнении экспериментальных работ, присутствует лишь частично.

Результаты

- Известно, что иммортализованные клетки потенциально могут обладать необычными свойствами. Поэтому для подтверждения каких-либо эффектов считается важным проведение дополнительных экспериментов с использованием альтернативных клеточных линий. Однако исследование действия этопозидов проводилось с использованием единственной клеточной линии Jurkat (иммортализованной клеточной линии, полученной из T лимфоцитов);

- Мне кажется, что рассматриваемая работа также выиграла бы, если бы в качестве контрольного эксперимента действие этопозидов также было бы исследовано на какой-либо клеточной линии, полученной не из клеток крови;

- В диссертации отсутствует четкое обоснование того, почему для получения культуры клеток iAML/ETO использовалась суспензионная

культура LCL (RPMI-8866), в то время как эффекты были продемонстрированы ранее для клеточной линии Jurkat.

Общие замечания

- В заголовках третьего и четвертого порядков отсутствует нумерация;
- В тексте встречаются «протеаза» и «металлопротеаза» вместо протеиназа и металлопротеиназа;
- Названия рестрикционных эндонуклеаз приведены без использования наклонного шрифта;
- Неудачные обороты:
 - Стр. 27: «специалист по на химическому оружию»
 - Стр. 32: «TOP2 β выполняет довольно узкие функции»
 - Стр. 32: «демонстрируют тонкие дефекты в развитии нервных клеток»
 - Стр. 59: «Отбрасывание возможных артефактов»
 - Стр. 61: «Чистили ДНК»
 - Стр. 92: «В состав промотора входит минимальный CMV-промотор»

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 — «Молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, и оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ломов Николай Андреевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент,
Директор Института молекулярной медицины,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)


ЗАМЯТНИН Андрей Александрович

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 622-98-43, e-mail: zamyatnin_a_a@staff.sechenov.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная биология, 03.02.02 – Вирусология

Адрес места работы: 
119991, г. Москва ул. Трубецкая, д. 8, Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования Первый
Московский государственный медицинский университет имени И.М.
Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет), Институт молекулярной медицины,
Тел.: +7 (495) 609-14-00; e-mail: zamyatnin_a_a@staff.sechenov.ru