

ОТЗЫВ официального оппонента
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»

Актуальность темы:

Диссертация Ломова Николая Андреевича на тему: «Изучение механизмов образования транслокаций, ассоциированных со вторичными лейкозами, вызванными терапией ингибиторами ДНК-топоизомераз II», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, посвящена изучению молекулярных механизмов возникновения ассоциированных с химиотерапией топоизомеразными ядами вторичных лейкозов. Терапия с применением топоизомеразных ядов очень эффективна, однако имеет побочный эффект - у части пациентов развивается так называемый вторичный лейкоз, для которого характерны острое течение заболевания и неблагоприятный прогноз. Возникновение вторичных лейкозов сопровождается транслокациями, затрагивающими гены важных транскрипционных факторов - AML1 (RUNX1), и MLL (KMT2A). Образующиеся в результате транслокации слитые AML1- и MLL-белки приводят к нарушению баланса активирующего и репрессирующего действий AML1 и MLL. Набор партнеров по транслокациям этих генов ограничен. Спектр партнеров по транслокациям может определяться как пространственной сближенностью генов-партнеров, так и кластеризацией подвижных разрывов с последующей репарацией по механизму NHEJ. Изучение механизмов, задействованных в образовании хромосомных транслокаций, и факторов, оказывающих влияние на частоту таких транслокаций затруднено по нескольким причинам. Во-первых, формирование транслокаций — крайне редкое событие; во-вторых, прямая

детекция транслокации возможна только методом флуоресцентной гибридизации с пробамми к генам-партнерам – сложным и трудоемким методом. Сложность изучения механизмов образования транслокаций как на животных, так и на культурах клеток под действием этопозида делает необходимым создание простой экспериментальной модели, позволяющей изучать молекулярные механизмы возникновения вторичных лейкозов. С другой стороны, представляется важным изучение особенностей локализации генов-партнеров по транслокациям в пространстве ядра. Поэтому тема диссертационной работы представляется крайне актуальной.

Новизна и научная значимость.

Ген MLL, транслокации которого ассоциированы с большей частью вторичных лейкозов, изучен достаточно основательно. Ген AML, который также является мишенью транслокаций, индуцированных топоизомеразными ядами, исследован менее глубоко. Все данные, касающиеся поведения гена AML в клетках, обработанных этопозидом, особенностей его локализации и репарации, являются новыми и приоритетными. Особую ценность работе придает создание экспериментальной модели, позволяющей изучать процесс формирования транслокаций гена AML под действием топоизомеразных ядов.

Модель позволяет индуцировать транслокации, мимикрируя действие топоизомеразных ядов и определять число транслокаций с помощью количественной ПЦР. Созданная модель позволяет изучать влияние различных условий на вероятность образования заданной транслокации, испытывать препараты, используемые в химиотерапии, на предмет возможности возникновения транслокаций под их воздействием. Наконец, такая клеточная модель является тест-системой для поиска веществ, способных снизить вероятность развития вторичного лейкоза после терапии с применением ингибиторов ДНК-топоизомераз II. Новизна, научная значимость и практическая важность представленной работы несомненны.

Структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 142 страницах, содержит 36 рисунков и 5 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка публикаций по теме работы и списка цитированной литературы, включающего 391 источник.

В разделе Введение автором обосновываются актуальность тематики, формулируются цели и задачи, указываются основные положения, выносимые на защиту и примененные методические подходы, приводятся данные о публикациях.

Обзор литературы затрагивает широкий круг вопросов, непосредственно относящихся к теме диссертации: охарактеризованы гены-мишени, которые затрагиваются транслокациями при вторичных лейкозах, механизмы действия топоизомеразных ядов, механизмы репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Отдельный раздел посвящен описанию факторов, влияющих на частоту транслокаций и разработанным к настоящему времени моделям хромосомных транслокаций. Литературный обзор написан логично, хорошо структурирован, все затрагиваемые темы имеют непосредственное отношение к теме диссертации. Высокое качество литературного обзора, широкая эрудиция автора, знание в деталях литературы по теме диссертации указывают на профессионализм автора.

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне, с использованием современных высокотехнологичных молекулярно-биологических и микроскопических методов и статистических инструментов. Глава Материалы и методы написана достаточно подробно.

В разделе Результаты логично и последовательно описаны все этапы работы. Автором изучена внутриядерная локализация гена AML (одной из мишеней транслокаций, ассоциированных с вторичными лейкозами). Показано, что, в отличие от у-иррадиации, обработка топоизомеразными ядами приводит к выходу концов поврежденного аллеля за пределы собственной хромосомной территории. Однако, анализ контактов с

привлечением методологии 4C не выявил предпочтительных контактов генов AML и MLL с соответствующими партнерами по транслокациям. Вероятно, отсутствие такого обогащения обусловлено тем, что выход за пределы хромосомной территории – событие крайне редкое, и направленного движения в гипотетические репарационные центры в данной экспериментальной модели не происходит. Анализ микроскопических данных проведен с использованием разработанной автором совместно со специалистами по биоинформатике программы и сопровождается серьезной статистической обработкой.

Редкость события транслокации обусловило разработку авторами клеточной модели, позволяющей воспроизводить с определенными ограничениями процесс внесения двуцепочечных разрывов и их последующей репарации и оценить вероятность транслокаций в этой искусственной системе. Автор подробно описывает технологию получения модельной клеточной культуры и детекции транслокаций. С использованием разработанной модельной системы автором изучено влияние ингибиторов репарации на частоту транслокаций. Интересные результаты получены при анализе частоты транслокаций в полученной модельной системе, которые индуцируются соединениями, используемыми в химиотерапии опухолей совместно с ингибиторами ДНК – топоизомеразы II.

Раздел Обсуждение результатов отнюдь не является кратким механическим повторением результатов. Автор сопоставляет собственные результаты со сложившимися в данной области исследований представлениями, что свидетельствует о научной зрелости автора.

Выводы работы полностью отражают полученные результаты и не вызывают сомнений в своей адекватности и достоверности.

Степень обоснованности научных результатов, выводов и рекомендаций.

Основные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации, данные в работе, хорошо обоснованы и подтверждены публикациями в рецензируемых международных журналах.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.

Достоверность научных результатов сомнений не вызывает. Экспериментальная часть выполнена с использованием современной научной базы, методов и подходов. Выводы диссертации согласуются с известными теоретическими моделями, практическими знаниями и экспериментальным опытом.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати.

По материалам диссертации опубликовано семь печатных работ, основные результаты представлены в форме устных и стендовых докладов на значимых конференциях. Высокая публикационная активность несомненно отражает актуальность исследований и перспективу внедрения в практику полученных результатов.

Оценка содержания диссертации в целом, замечания и вопросы по содержанию диссертации.

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Полученные автором результаты не вызывают сомнений, выводы надежно подкреплены экспериментальными данными и являются вполне обоснованными.

К работе есть несколько замечаний:

Прежде всего – важной характеристикой действия ингибиторов топоизомеразы является молекулярно-весовое распределение результирующих фрагментов ДНК. Анализ среднего размера полученных фрагментов позволил бы более обоснованно подобрать концентрации ингибитора и время репарации. Однако эта важная характеристика в работе отсутствует.

Есть небольшие технические замечания. В изложении результатов микроскопии присутствует очевидная терминологическая путаница. Анализ микрофотографий не позволяет фиксировать факт разрыва. При предложенном дизайне эксперимента визуализируется событие расхождения

поврежденных концов ДНК, однако неразошедшиеся разрывы из рассмотрения выпадают, однако автор называет неразошедшиеся разрывы неповрежденными локусами, что неправильно. Кроме того, использованные для гибридизации флуоресцентные пробы слишком велики по размеру и составляют на глаз до 10% от площади хромосомной территории. Это существенно уменьшает разрешение метода и ухудшает возможность визуализации выхода концов поврежденного локуса за пределы территории.

Кластеризация разрывов и сближение партнеров по транслокациям при обработке культуры клеток этопозидом может существенным образом зависеть от кинетики репарационных процессов. Поэтому отсутствие предпочтений в контактах, выявленное методом 4С может и не отражать реального положения вещей. Это обстоятельство следовало учитывать, планируя эксперименты по фиксации конформации хомосом.

Некоторые неоднозначные места в работе автор видит и обсуждает сам, что свидетельствует о серьезном отношении к методологии исследований. В частности, внесение единственного разрыва в модельной системе не вполне отражает происходящее под воздействием этопозида, когда таких разрывов тысячи и тысячи. Именно наличие множественных повреждений, по современным представлениям, дестабилизирует геном и увеличивает подвижность поврежденных локусов. Правильнее было бы оценивать вероятность транслокации при индукции искусственного разрыва на фоне обработки клеток этопозидом или блеомицином. Возможно в этом случае, автору удалось бы наблюдать выход концов индуцированного разрыва за пределы хромосомной территории в созданной им модельной системе.

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,
главный научный сотрудник лаборатории
структурно-функциональной организации хромосом
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биологии гена
Российской академии наук
профессор

Яровая О.В.

09.02.2023

Контактные данные:

тел.: +7(962)9677771

e-mail: iarovaia@inbox.ru

Шифр и наименование специальности, по которой защищена диссертация:
1.5.3. (03.01.03) - молекулярная биология

Адрес места работы:

119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биологии гена Российской академии наук, лаборатория структурно-
функциональной организации хромосом

Тел.: +7 (499) 135-60-89, 135-60-13, 135-14-03;

E-mail: info@genebiology.ru



подпись О.В. Яровой

ЗАВЕРЯЮ

РАН

МАНСУРОВА Г.В.