

## Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Нерсисяна С.А. “Роль функциональной активности микроРНК и их изоформ в патогенезе злокачественных опухолей человека”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – “Молекулярная и клеточная биология”

Наши знания о механизмах функционирования клетки постоянно обогащаются, что особенно верно для последней декады, в большой мере благодаря внедрению новых методов исследования. Сегодня это, в основном, относится к использованию биоинформатического инструментария.

Первая информация о небольших, некодирующих молекулах РНК появились в печати в начале девяностых XX века, но широким фронтом работы по их классификации и изучению функций развернулись, начиная с нулевых годов XXI века.

Как всегда, с появлением принципиально новых объектов и на начальных фазах этих исследований возникло больше вопросов, чем ответов. Для выяснения роли низкомолекулярной РНК в норме и при патологических проявлениях, за 20 лет интенсивной работы много сделано. В настоящее время известно несколько типов небольших РНК (si-, Piwi- mi), размером 18-25 нуклеотидов. Это небольшие РНК, которые регулируют ряд биологических процессов, в основном, путем даун-регуляции экспрессии генных мишеней, хотя в случае с микроРНК ситуация сложнее.

Приоритетное направление работы Нерсисяна это исследование роли некодирующих микроРНК в онкогенезе, с целью диагностики, а также возможного направленного вмешательства в этот патологический процесс. Нужно подчеркнуть, что микроРНК обнаружены у многих млекопитающих, их кодирует и ряд вирусных геномов, что, учитывая экономную организацию вирусов, подчеркивает важную регуляторную роль такой РНК. Thomas Treiber и др. в 2019 предложили детально разработанную схема биогенеза микроРНК и возможный механизм его взаимодействия с другими метаболическими путями (Regulation of miRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways, Thomas Treiber, Nora Treiber and Gunter Meister, doi: 10.1038/s41580-018-0059-1). Эта работа исчерпывающе обсуждается в рецензируемой работе.

Диссертантом четко сформулирована цель работы: выяснить роль микроРНК в патогенезе злокачественных опухолей человека, в основном, методами биоинформатики. Учитывая малое количество исследований по микроРНК

биоинформатическими методами, а также небольшое количество массовых исследований пула микроРНК при патологиях, тема работы актуальна, как чисто фундаментальное исследование, так и для решения прогностических задач в онкологии.

Для достижения указанной цели, определены 5 задач, формулировка и решение которых также иллюстрирует новизну и актуальность предпринятого исследования.

1. Оценить точность разрезания шпилек при-/пре-микроРНК ферментами Drosha и Dicer при различных видах рака.
2. Определить множество изоформ микроРНК, экспрессированных в различных злокачественных опухолях человека, предсказать гены-мишени и оценить влияние вариации одного нуклеотида с 5'-конца молекулы на множество мишеней.
3. Создать веб-портал, содержащий информацию об экспрессии и активности изоформ микроРНК при различных видах рака.
4. Разработать, программно реализовать и апробировать алгоритм для построения сетей взаимодействий изоформ микроРНК, генов и транскрипционных факторов по данным профилей экспрессии РНК в выборке образцов и базам данных взаимодействий.
5. Выявить ключевые взаимодействия изоформ микроРНК и их мишеней, играющие роль в патогенезе раков молочной железы и кишечника; использовать найденные взаимодействия для нахождения прогностических маркеров.

Первая задача относится к выяснению точности катализа ферментов Drosha и Dicer, вовлеченных в синтез микроРНК, которую можно определить двумя подходами при помощи биоинформатической оценки, как и сделано в работе, или биохимически, при помощи методов классической биохимии. В результате исследования оказалось, что Drosha производит гомогенные разрезанные шпильки в 86% случаев, Dicer – в 58%. Нужно сказать, что функции этих ферментов сейчас активно изучаются и если для Drosha известно немного, то показано, что дефицит Dicer приводит к тяжелым нарушениям и летальному исходу у мышей.

Мой вопрос к этой части работы: в чем причина неточного или неполного РНКазного катализа, различия объясняются локализацией или низким средством, или чем то другим? Что дает эта оценка для достижения цели работы?

Конечно эта часть работы проливает свет на особенности биосинтеза микроРНК, но, по моему, с дальнейшим планом исследования она слабо связана.

Затем, в работе был предпринят корреляционный анализ уровней экспрессии 5'-изоформ микроРНК и мишеней. Здесь диссертантом проделана большая работа по выявлению связи между изоформами и потенциальными генами-мишенями. Показано, что активность 5'-изоформ микроРНК существенно варьировалась между различными видами рака, однако в большинстве случаев среднее значение активности не превышало 10, что на порядок ниже соответствующего значения для предсказаний, основанных лишь на исследовании нуклеотидных последовательностей микроРНК и потенциальной мишени. То есть данной изоформе микроРНК, в среднем соответствовало 209 генов-мишеней при предсказании на основе последовательности и на порядок меньше при дополнительном опухоль-специфическом анализе. При этом пара изоформ одной микроРНК с отличием в один нуклеотид с 5'-конца в среднем имела лишь 6% общих мишеней, что подтверждает важность рассмотрения изоформ микроРНК в качестве отдельных функциональных единиц.

Этот, на мой взгляд очень интересный факт, объясняет большое количество ложноположительных результатов при предсказаниях, основанных на сравнении нуклеотидных последовательностей микроРНК и мишени и свидетельствует в пользу примененного в резенируемой работе метода. Такой результат нелишне взять на заметку во многих биоинформатических исследованиях, когда основываясь только на данных скрининга, а фактически докинга, делаются малообоснованные выводы о фармакологических свойствах новых соединений.

Высокая экспрессия микроРНК является необходимым, но не достаточным фактором для подавления синтеза ряда генов-мишеней. Чтобы сделать профили экспрессии 5'-изоформ микроРНК и результаты предсказаний их мишеней легкодоступными, был создан специальный веб-портал при помощи которого можно осуществлять поиск по трем параметрам: 5'-изоформа микроРНК, ген, вид рака. В работе приводятся наглядные примеры такого поиска.

Портал дает возможность получить информацию о взаимодействиях различных микроРНК и их мишеней при выбранном виде рака, статистику для 5'-изоформ микроРНК в выбранном типе рака, визуализацию экспрессии изоформ выбранной микроРНК, результаты корреляционного анализа между выбранной изоформой микроРНК и ее предсказанными мишеням, или предсказанными регуляторами выбранного гена, а также визуализация совместного распределения соответствующих уровней экспрессии.

Солидная часть работы посвящена анализу регуляторной сети микроРНК-ген-транскрипционный фактор при раке молочной железы. Построенная сложная сеть взаимодействий триады содержала более 350 вершин, включая 312 генов и 59

микроРНК. Наибольшее число взаимодействий пришлось на регуляцию экспрессии генов (371 ребро) и микроРНК (73 ребра) с помощью ТФ, связыванию микроРНК и мишеней (69 ребер), и лишь 11 ребер соответствовали ко-экспрессии генов-хозяев и интронных микроРНК. Полученные при этом результаты предсказывают незначимую роль взаимодействий между интронными микроРНК и их генами-хозяевами, тогда как большое количество исследований автоматически рассматривает всевозможные взаимодействия данного вида. Это направление, ввиду его новизны и оригинальности, думаю, нуждаются в дальнейшем развитии, а пока на основе предложенной сети делается вывод, что наибольшее число взаимодействий приходится на регуляцию экспрессии генов и микроРНК с помощью ТФ, связыванию микроРНК и мишеней.

В работе, на основе модельных экспериментов, делается вывод, что гипоксия может быть регуляторным фактором экспрессии микроРНК при колоректальном раке и, что универсальным микроРНК-маркером гипоксии является микроR-210-результат, могущий иметь практическое применение. Я здесь выражаю осторожный оптимизм, поскольку известно какое большое число исследований посвящено диагностическим и прогностическим биомаркерам рака на основе уровней экспрессии микроРНК.

Такая активность напоминает мне бум после обнаружения некоторых тканеспецифических белков и попыток понять факт их появления при онкогенезе, который привел к появлению в клинической практике целого ряда маркерных антигенов, имеющих ограниченное применение.

Для всеобъемлющего понимания роли микРНК хотелось бы видеть внимание автора и к роли микРНК в норме; при нормальных физиологических состояниях каков спектр и уровень этих молекул, степень вовлеченности в регуляции нормальных, а не только патологических реакций? Даже если эта не есть цель работы, в обзоре литературы было бы интересно обсудить эту роль. Например: есть ли разница в экспрессии различных изоформ микРНК в норме и при патологических проявлениях и какова и роль в норме (клеточная пролиферация, дифференциация, реакция на изменения физиологического статуса).

Заключение, в основном, воспроизводится в выводах и думаю его можно было бы опустить без особого ущерба для работы.

Несколько вопросов и замечаний, которые я сформулировал, ни в коей мере не нужно воспринимать как недостатки работы, таковых по моему нет. Я всего лишь выразил свое мнение, что кое что можно было бы сделать несколько иначе.

В целом нужно сказать, что работа проделана очень большая, насыщенная, в ней совсем “нет воды”. Вытекающие из цели, адекватно сформулированные задачи

решены полностью, что отражено как в заключении и выводах, так и в публикациях и наконец, она прекрасно оформлена и заслуживает самой высокой оценки.

Обобщая вышесказанное, я прихожу к однозначному выводу, что работа “Роль функциональной активности микроРНК и их изоформ в патогенезе злокачественных опухолей человека” соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Степан Нерсисян, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - “Молекулярная и клеточная биология и прошу моих коллег из ученого совета поддержать этот вывод своим голосованием.

Официальный оппонент,

Зав. лаб. компьютерного моделирования биологических процессов

ИМБ НАН Армении, д.б.н.



К.Б. Назарян

Подпись К.Б. Назаряна заверяю:

Ученый секретарь Института молекулярной

биологии НАН РА, к.б.н.



З. А. Хачатрян