

“УТВЕРЖДАЮ”

Заместитель директора
по научной работе
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова Российской академии наук



18 сентября 2019 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Андриановой Марии Александровны

«Характеристики точечного мутагенеза в раковых клетках человека»

Представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Актуальность выбранной темы для науки и практики. В настоящее время считается, что основной механизм развития раковой опухоли – это накопление новых (соматических, то есть не представленных в зародышевой линии) мутаций и генетических перестроек в ДНК клеток, как предшествующих образованию опухоли, так и непосредственно приводящих к её образованию. Мутационный спектр опухоли в рамках этого предположения отражает процесс онкогенеза.

В диссертационной работе Марии Александровны Андриановой проводится подробный и разносторонний анализ соматических мутационных процессов в клетках нескольких типов раковых опухолей. Особое внимание уделяется асимметрии этих процессов между лидирующей и отстающей цепями ДНК при репликации и асимметрии, ассоциированной с транскрипционными процессами.

Этот инструментарий является новаторским, его разработке посвящены несколько разделов диссертационной работы, и он прекрасно дополняет общепринятый на данный момент подход, описывающий различные мутационные процессы характерными для них подписями, то есть типичными для этих процессов заменами нуклеотидов, происходящими в определённом контексте. Новый подход позволил автору описать ранее не поддававшиеся описанию аспекты возникновения и репарации молекулярных повреждений в ходе развития раковых опухолей.

Тема является актуальной, поскольку благодаря развитию технологий секвенирования накапливается все больше геномных данных для раковых образцов. Молекулярная диагностика на основе этих данных становится одним из неотъемлемых шагов постановки диагноза и понимания механизма развития опухоли. Речь идёт как о научном понимании процессов онкогенеза, так и о практических задачах диагностики и выбора терапии. При этом по мере роста объёма геномных данных становятся практически реализуемы и востребованы подходы, сочетающие идентификацию отдельных онкогенных мутаций со статистическими полногеномными описаниями мутационных данных, позволяющими описывать мутационные процессы в опухолях и связывать их с поломками определённых генов. Развитию таких подходов и посвящена работа Марии Александровны Андриановой.

Структура работы. Диссертация изложена на 114 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение в четырёх главах, основные результаты и выводы, список литературы и приложения. Работа включает 37 рисунков и 9 таблиц в основном тексте, а также 9 рисунков и 7 таблиц в приложении. Список литературы содержит 128 ссылок.

Во Введении описывается актуальность работы, степень разработанности темы, цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора в исследование, степень достоверности и апробация результатов, структура и объём диссертации и список

сокращений. В обзоре литературных данных (Глава 1) вводятся основные понятия, используемые в работе, а именно «мутационные процессы», «мутационные подписи», «мутационная асимметрия». Автор дает краткое описание системы репликации как возможного источника мутаций, а также систем репарации, исследование которых проводится в работе. Также в обзоре литературы излагается материал об изменении мутационных процессов в ходе развития опухоли. Главы 2, 3, 4 и 5 построены по сходной схеме. Каждая глава содержит раздел с материалами и методами, раздел с результатами и их обсуждением. Глава 2 посвящена изучению асимметрии в накоплении и исправлении повреждений на лидирующей и отстающей цепях ДНК. В главе 3 проведено исследование двух конкретных клинических случаев детских глиобластом и установлен молекулярный механизм их ультрамутабельного фенотипа. Глава 4 содержит подробный мутационный анализ образцов базальноклеточной карциномы, который позволил определить особенности образования мутационных повреждений ДНК и их репарации в данном типе рака кожи. Наконец, глава 5 посвящена изучению мутационных процессов на отдельных стадиях онкогенеза, а не только на основе итогового набора мутаций в опухоли в целом, для чего исследуются взаимосвязи между мутационными подписями и клональными характеристиками исследуемых мутаций.

Каждая глава представляет собой самостоятельное исследование, при этом главы объединены общей тематикой и логически связаны.

Новизна и значимость основных научных результатов, полученных диссертантом. Диссертационная работа Марии Александровны Андриановой носит теоретический характер и посвящена исследованию мутационных процессов в онкологических новообразованиях и разработке методов такого исследования. Как полученные результаты, так и разработанные методы представляют несомненный научный интерес и при этом могут быть использованы на практике, например, для молекулярной диагностики типов и подтипов рака на основе результатов

секвенирования ДНК больного, а, в перспективе, и для выбора адекватной подтипу рака терапии.

Основные результаты, полученные соискателем, следующие:

1. Показано, что полимеразы дельта при репликации отстающей цепи ДНК делает больше ошибок, чем полимеразы эпсилон при репликации лидирующей цепи. Это приводит к различию в скоростях мутационных процессов между лидирующей и отстающей цепями. Система репарации неправильно спаренных нуклеотидов компенсирует эту асимметрию за счет того, что исправляет больше повреждений на отстающей цепи. Таким образом, автором впервые установлена природа возникновения асимметрии в скоростях мутационных процессов на лидирующей и отстающей цепях ДНК в раковых образцах с инактивированной системой репарации неправильно спаренных нуклеотидов.
2. Исследованы два клинических случая детских глиобластом и показано, что их ультрамутабельный фенотип объясняется одновременной инактивацией системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов и мутацией в экзонуклеазном (исправляющем ошибки) домене полимеразы эпсилон. Анализ, представленный в этой главе, может быть применен и для других случаев ультрамутабельных опухолей для уточнения молекулярного механизма.
3. Разработан статистический тест, с помощью которого показано, что доля мутаций под положительным отбором в ультрамутабельных глиобластомах как минимум в 2 раза ниже, чем в слабо мутабельных глиобластомах.
4. Показано, что в базальноклеточной карциноме доля мутаций, характерных для воздействия ультрафиолетового излучения, выше, чем в меланоме, и эффективность репарации таких мутаций также выше. Установлено, что мутации C>A имеют разную природу в базальноклеточной карциноме и в меланоме: в базальноклеточной карциноме они, в основном, вызваны окислением гуанинов, а в меланоме представляют собой смесь мутаций окисления гуанина и мутаций цитозина под воздействием ультрафиолетового излучения.

5. Исследовано изменение активности мутационных процессов в ходе развития раковой опухоли. Показано, что доля мутаций, представляющих определенный мутационный процесс, может изменяться со временем. В отличие от предыдущих исследований, агрегировавших данные по нескольким образцам, в работе продемонстрировано изменение активности мутационного процесса внутри одного конкретного образца. Также показано, что изменение активности мутационного процесса влияет не только на особенности мутационного спектра, но и на распределение мутаций вдоль генома и между цепями ДНК.

Обоснованность и достоверность научных результатов и выводов.

Обоснованность результатов следует из адекватного и хорошо продуманного статистического анализа больших объёмов данных о мутационных процессах в раковых опухолях, основанного на современном инструментарии. Сами полученные результаты согласуются с ранее известными, при этом содержательны и новы. Результаты были представлены на нескольких конференциях, в том числе международных, и в качестве трех статей опубликованы в международных рецензируемых журналах *Genome Research* и *Journal of Pathology* (первым автором), а также *Nature Genetics*.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Использованные автором методы изучения мутационной асимметрии могут быть использованы для анализа других типов рака с целью уточнения молекулярного механизма их развития, а также особенностей накопления повреждений и их репарации. Разработанный автором статистический тест для оценки доли мутаций под положительным отбором, может быть использован для дальнейшего изучения отбора в раках с повышенными скоростями мутирования. Изучение мутационных процессов на разных этапах развития опухоли может быть в дальнейшем использовано для поиска субклональных драйверных мутаций, а также для изучения процессов малигнизации. Как результаты работы, так и разработанные методы могут применяться для диагностики типов или подтипов рака, анализа

происходящих в процессе новообразования мутационных процессов, и могут использоваться при выработке рекомендаций по назначению терапии рака.

Замечания к работе. Работа хорошо продуманна, логична, интересна, хорошо написана. Тем не менее, есть несколько замечаний к изложению.

1) Красивая формула 1, сводящая результаты трёх разных экспериментов и неизвестную величину асимметрии мутационной активности полимераз эпсилон и дельта в одно уравнение, аннотирована слишком кратко, чтобы быть очевидной.

2) В работе несколько раз приведена подпись APOBEC (2 и 13 по COSMIC) и не упомянуто, что по распространённой версии, признаком активности является не только перепредставленность этого мутационного контекста, но и его пространственная кластеризация (цепочки замен).

3) При ссылках на раздел подписей базы данных COSMIC лучше приводить дату обращения к базе. К сожалению, этот раздел COSMIC не синхронизирован с версиями остальной базы данных и имеет иногда изменяется без какой бы то ни было документации.

4) В разделе 3.2.8 исследуется доля мутаций под положительным отбором в ультрамутабельных и немутабельных глиобластомах. Не может ли быть такого, что на самом деле отношения частот мутаций-драйверов, находящихся под положительным отбором и остальных мутаций (пассажиры) совпадают, но при малом абсолютном числе мутаций в немутабельных раках мутации-пассажиры статистически хуже детектируются.

5) В главе 5 при исследовании изменений активности мутационного процесса во времени учитывается ли тот факт, что некоторые опухоли могут быть очень агрессивными и не иметь поздних клонов по причине быстрой летальности этих типов рака?

Также имеется ряд недочетов в оформлении рисунков. Например, на рисунке 2.3 отличается порядок замен на панели (а) и на панели (б), что затрудняет восприятие. На рисунке 5.4 используются те же цвета, что на рисунках 5.3 и 5.5, однако цветовой код имеет совершенно другое значение.

Все эти замечания не уменьшают высокого качества, научной, и практической ценности диссертационной работы, представленной Марией Александровной Андриановой на защиту.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Полученные результаты имеют фундаментальное и практическое значение и вносят вклад в понимание механизмов, лежащих в основе возникновения наиболее распространенной формы РРС и изменений в активности ее течения. Результаты диссертации могут использоваться при проведении научных исследований в области молекулярной медицины, физиологии, молекулярной биологии и биоинформатики. Описанные в диссертации методы и статистические закономерности могут быть использованы в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной генетики РАН, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии гена РАН, Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Научно-исследовательском институте медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра РАН, Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первом Московском государственном медицинском университете имени И.М. Сеченова МЗ РФ, Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, Новосибирском государственном университете и других учебных и научно-исследовательских организациях.

Заключение по работе

Диссертационная работа представляет собой законченное исследование на актуальную тему, проведенное на высоком научном уровне. Выводы, полученные в работе, научно обоснованы и достоверны, строго сформулированы и следуют из поставленных целей, задач и результатов исследования. Автореферат работы построен по традиционному плану и хорошо отражает содержание диссертации. Полученные результаты имеют важное теоретическое и практическое значение.

Диссертационная работа Марии Александровны Андриановой «Характеристики точечного мутагенеза в раковых клетках человека» отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции с изменениями, утверждёнными Постановлением Правительства Российской Федерации от 1 октября 2018 г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Работа и отзыв заслушаны и одобрены на научном семинаре Отдела вычислительной биологии ИОГен РАН. Присутствовало 12 человек: «за» - 12 человек, «против» - нет, воздержались - нет (протокол заседания №1 от 03 сентября 2019 г.). Основное направление научно-исследовательской работы отдела соответствует тематике диссертационной работы.

Отзыв подготовлен:

К.ф-м.н, с.н.с лаборатории
системной биологии и вычислительной генетики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН

 Фаворов Александр Владимирович

Подпись А.В. Фаворова заверяю:

Заместитель директора по научной работе Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,

Кандидат биологических наук, доцент
 Брускин С.А.

Адрес организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им.
Н.И. Вавилова Российской академии наук

119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д.3

Тел.: (499) 135-62-13

Email: iogen@vigg.ru

Электронный адрес и телефон составителя отзыва:

Фаворов А.В. favorov@vigg.ru, тел. +7 (916) 915 5809

18 сентября 2019 г.

