

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института биофизики клетки РАН
чл.-корр. РАН Е.Е. Фесенко



« 20 » февраля 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Соколовой Евгении Александровны
«Флуоресцирующая модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека
и ее использование для оценки эффективности таргетного иммунотоксина на основе
экзотоксина А», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Актуальность темы. Получение новых знаний в области физиологии и клеточной биологии во многом связано с развитием новых биофизических методов визуализации клеток *in situ*, среди которых особое место занимают флуоресцентные методы анализа. В настоящее время в этой области активно применяются генетически-кодированные флуоресцирующие репортеры – флуоресцентные белки. Флуоресцентные белки широко используются для изучения структуры и динамики процессов в живых системах на разных уровнях организации – от единичных молекул до целого организма. В развитии технологий с использованием флуоресцентных белков можно выделить следующие основные направления: переход от процесса визуализации структуры к функциональному имиджингу и увеличение глубины и контрастности изображения. Последнее достигается путем создания красных и дальне-красных флуоресцентных белков, излучающих в области «окна прозрачности» биологической ткани. Одной из областей применения флуоресцентных белков является создание флуоресцирующих моделей (флуоресцентно-маркированных клеточных линий, трансгенных животных) для исследования механизмов действия различных терапевтических препаратов. Создание таких флуоресцирующих моделей и их использование для решения задач экспериментальной биомедицины в настоящее время является актуальной задачей. После создания маркированной клеточной линии необходимо сконструировать таргетный агент, селективно связывающийся с данными клетками. Наиболее часто мишенями таргетных агентов служат молекулы на поверхности клетки, уровень экспрессии которых в опухолевых клетках значительно выше, чем в нормальных тканях.

Диссертационная работа Соколовой Е.А. посвящена созданию флуоресцирующей модели опухоли яичника человека, а также исследование противоопухолевой активности таргетного рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40, созданного на основе экзотоксина А, мишенью которого является трансмембранная рецепторная тирозинкиназа

HER2, human epidermal growth factor receptor 2 (p185HER2) гиперэкспрессия которой наблюдается в некоторых типах солидных опухолей.

Новизна исследования, полученных результатов и выводов. Таким образом, цель работы заключалась в получении флуоресцирующей модели HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека и ее использовании для изучения эффективности созданного HER2-специфичного иммунотоксина. В результате проведенных исследований автором получено несколько принципиально новых и интересных результатов: создана новая ксенографтная модель аденокарциномы яичника человека, в которой стабильно экспрессирован флуоресцентный белок Katushka, спектр эмиссии которого лежит в дальнекрасной области терапевтического окна прозрачности биологических тканей; показана высокая информативность созданной модели для прижизненной визуализации развития опухоли в организме животного методом флуоресцентного имиджинга; впервые получен рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40, содержащий в составе анти-HER2 антитело 4D5scFv и фрагмент псевдомонадного экзотоксина А; разработанная флуоресцентная модель использована для оценки эффективности действия созданного в работе рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40; показан выраженный противоопухолевый эффект иммунотоксина 4D5scFv-PE40 *in vivo*.

Анализ содержания диссертации. Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 219 ссылок, из которых 214 на иностранном языке. Работа изложена на 134 страницах, включает 33 рисунка. Список литературы содержит 219 источников.

Во введении автором убедительно и аргументированно обоснована актуальность проблемы развития технологий функционального имиджинга с использованием флуоресцентных белков.

Глава «Обзор литературы» включает три раздела, посвященные флуоресцентным белкам и их применению в экспериментальной онкологии, биологии рецептора HER2 и современному состоянию таргетной терапии HER2-положительных типов рака, и классу перспективных бифункциональных таргетных противоопухолевых агентов – иммунотоксинов. В целом обзор литературы написан хорошим языком и логично структурирован.

Материалы и методы описаны достаточно подробно, что позволяет воспроизвести использованные автором методы без привлечения дополнительной литературы. Следует

подчеркнуть многообразие использованных в работе методов и высокую трудоемкость выполненных автором исследований. Широкое применение в работе нашли флуоресцентные методы анализа как на уровне отдельных клеток (лазерная сканирующая микроскопия, иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитофлуориметрия и оптическая сортировка клеток), так и на уровне целого организма (флуоресцентный имиджинг опухолей в организме лабораторного животного). В целом, работа демонстрирует, что автор владеет широким арсеналом современных методов биохимии, биофизики и молекулярной биологии и, несомненно, свидетельствует о его высокой методической квалификации.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит четыре раздела. В первом разделе описан процесс получения флуоресцирующей ксенографтной модели HER2-гиперэкспрессирующей аденокарциномы яичника человека. Для получения этой модели линия клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 предварительно была стабильно трансфицирована геном дальне-красного флуоресцентного белка Katushka с максимумом излучения при 635 нм. Показано, что клетки полученной флуоресцирующей линии SKOV-kat обладают высоким уровнем экспрессии рецептора HER2 как в культуре, так и после их перевивки иммунодефицитной лабораторной мыши. Цитотоксичность 4D5scFv-PE40 была определена методом МТТ-теста для нескольких линий клеток с различным уровнем экспрессии рецептора HER2. Учитывая высокую актуальность разработки высокоселективных агентов для лечения HER2-положительного рака, полученная опухолевая модель представляется полезной и имеющей перспективы практического применения.

Во втором разделе исследованы возможности использования созданной модели для прижизненной неинвазивной визуализации динамики роста опухоли с помощью флуоресцентного имиджинга. Динамика роста подкожно привитой флуоресцирующей опухоли оценивалась автором по интегральной интенсивности флуоресценции от опухоли, регистрируемой *in situ*. Показано, что при небольших размерах опухоли интенсивность флуоресцентного сигнала от опухолевых клеток, с одной стороны, коррелирует с ее размером (объемом), а с другой – позволяет с первых дней эксперимента визуализировать и анализировать определенные параметры роста опухолевых клеток в узле. Таким образом, интенсивность флуоресцентного сигнала опухолевых клеток возможно использовать для эффективной оценки противоопухолевого потенциала препаратов. Использование данного подхода позволило выявить ингибирование роста опухоли под действием препарата цисплатина на значительно более раннем сроке, по сравнению со стандартным мониторингом внешнего объема опухоли.

Третий раздел состоит из двух частей. В первой описывается получение генетической конструкции рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40, в составе которого в единую полипептидную цепь объединены HER2-специфичное одноцепочечное антитело и токсический фрагмент псевдомонадного экзотоксина А. В качестве токсического модуля 4D5scFv-PE40 в работе использован 40 кДа фрагмент экзотоксина А (PE40) бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (PE). Известно, что токсический эффект PE40 обусловлен ингибированием биосинтеза белка в клетке за счет АДФ-рибозилирования эукариотического фактора элонгации трансляции 2 (eEF2). Эта наиболее трудоемкая часть работы потребовала подбора условий наработки рекомбинантного белка в бактериальных продуцентах, его хроматографическую очистку и верификацию методами гелелектрофореза и вестерн-блотинга. Во второй части описаны результаты оценки терапевтического потенциала полученного иммунотоксина в отношении HER2-гиперэкспрессирующей карциномы яичника человека с использованием созданной флуоресцирующей модели. Для оценки действия токсина были выбраны такие количественные параметры, как коэффициент скорости роста опухоли, период удвоения опухоли, коэффициент торможения роста опухоли. Анализ полученных данных показал существенный и статистически значимый ингибирующий эффект исследуемого иммунотоксина на развитие экспериментальной опухоли. Так, однократная инъекция иммунотоксина вызвала торможение опухолевого роста на 85% по сравнению с контролем на 17 день после инъекции опухолевых клеток.

В четвертом разделе механизмы токсического действия иммунотоксина 4D5scFv-PE40 исследованы на культуре клеток аденокарциномы яичника человека. Гибель клеток SKOV-3 под действием иммунотоксина оценивали по экстернализации фосфатидилсерина методом проточной цитофлуориметрии. Выявлено, что пикомолярные концентрации иммунотоксина вызывают апоптоз клеток, при этом данный эффект является высокоселективным по отношению к клеткам с высоким уровнем экспрессии HER2. Показано высокоаффинное связывание иммунотоксина с очищенным рецептором HER2, а также его специфичное взаимодействие с этим рецептором на клетках. Установлено, что иммунотоксин проникает в клетку путем клатрин-опосредованной интернализации и локализуется в клеточных органеллах аналогично молекуле псевдомонадного экзотоксина А дикого типа, транспортируясь из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум. Выявлено, что под действием иммунотоксина в клетках ингибируется биосинтез белка и происходит запуск апоптоза. На основе полученных результатов автором сделан вывод о том, что направляющий и токсический модули в составе иммунотоксина являются функционально активными, обеспечивая направленную его

доставку в HER2-положительные опухолевые клетки и их эффективную элиминацию. Это расценивается автором как предпосылка высоких значений терапевтического индекса при использовании созданного иммунотоксина в качестве HER2-специфичного таргетного препарата.

Для демонстрации корреляции цитотоксичности 4D5scFv-PE40 с количеством рецепторов HER2 эксперименты проводились на нескольких линиях клеток с различным уровнем экспрессии рецептора HER2. Для установления механизма интернализации 4D5scFv-PE40 использовали ингибиторный анализ путей эндоцитоза с применением хлорпромазина и филипина в качестве блокаторов клатринового и кавеолинового эндоцитоза, соответственно. Показано, что именно клатриновый рецепторный эндоцитоз, который обычно стимулируется в первую минуту после взаимодействия лиганда с рецептором, участвует в интернализации 4D5scFv-PE40.

Достоверный эффект противоопухолевых соединений цисплатина и 4D5scFv-PE40 по измерению флуоресценции наблюдался уже на 17-й день после инъекции опухолевых клеток, в то время как статистически значимая разница в объеме опухолей, измеряемая традиционным методом, была обнаружена только на 74-й день.

Таким образом, разработанная флуоресцентная модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека показала свою эффективность для ранней диагностики возникновения опухолей определенного типа. В целом следует отметить, что рецензируемая работа характеризуется четкой постановкой задач, высоким методическим уровнем их решения и квалифицированной интерпретацией полученных результатов.

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с другими соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Содержание автореферата и публикаций по результатам работы полностью отражают основные положения диссертации. Заключение и выводы диссертационной работы соответствуют цели и задачам проводившихся исследований, конкретны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. Материалы работы хорошо представлены на нескольких конференциях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Диссертационное исследование «Флуоресцирующая модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека и ее использование для оценки эффективности таргетного иммунотоксина на основе экзотоксина А» обладает несомненной значимостью с точки зрения как фундаментальных, так и прикладных исследований. Выполненная автором работа позволила создать

ксенографтную флуоресцирующую модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека, которая может быть использована в дальнейшем для тестирования свойств потенциальных терапевтических препаратов. Исследованы механизмы действия созданного в работе рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40, представляющего интерес в качестве потенциального агента для таргетной терапии. Результаты работы могут быть использованы в учебном процессе при разработке соответствующих спецкурсов для студентов биологических факультетов вузов.

Вопросы и замечания

1. Не ясно, насколько нужно проникновение токсина в клетку для реализации токсического действия, поскольку само антитело по данным литературы обладает ингибирующим опухолевый рост действием.
2. Хорошо бы привести данные о гибели клеток в присутствии блокатора клатрин-опосредованного эндоцитоза, когда нет транспорта внутрь клетки.
3. Желательно дать более четкое обоснование использования конструкции анти-HER2 антитело 4D5scFv и фрагмента экзотоксина А.
4. На рис. 13 показано ингибирование биосинтеза белка в клетках SKOV-3 при различных концентрациях иммунотоксина 4D5scFv-PE40. Чем объяснить непрерывную зависимость ингибирования при изменении концентрации на 6 порядков?

Заключение. Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень и научно-практическая значимость работы Соколовой Е.А. не вызывают сомнений. Диссертационная работа «Флуоресцирующая модель HER2-гиперэкспрессирующей опухоли яичника человека и ее использование для оценки эффективности таргетного иммунотоксина на основе экзотоксина А» удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям («Положение о порядке присуждения ученых степеней», Постановления Правительства Российской от 24.09.2013 г. № 842), а её автор, Соколова Евгения Александровна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «биофизика».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории внутриклеточной сигнализации ИБК РАН (протокол № 3. от « 10 » февраля 2017 г.)

Зинченко Валерий Петрович,
 профессор, доктор биологических наук,
 заведующий лабораторией внутриклеточной
 сигнализации ИБК РАН



В.П. Зинченко

Подпись
Зинченко В.П.
 Удостоверяю *Зав. лаб.*

ЗП 20.02.17

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки
Российской академии наук (ИБК РАН),

Адрес: 142290, г. Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3, ИБК РАН

Телефоны: (4967) 73-05-19, (4967) 33-05-09

Факс: (4967) 33-05-09

Телекс: 412615 BIO SU

E-mail: admin@ibc.psn.ru

Сайт: <http://www.icb.psn.ru>

Список основных публикаций Ведущей организации по теме диссертации за последние 5 лет:

1. Dolgacheva L.P., Turovskaya M.V., Dynnik V.V., Zinchenko V.P., Goncharov N.V., Davletov B., Turovsky E.A. Angiotensin II activates different calcium signaling pathways in adipocytes // Arch Biochem Biophys. 2016. V. 593. P. 38-49.
2. Зинченко В.П., Туровский Е.А., Туровская М.В., Бережнов А.В., Сергеев А.И., Дынник В.В. NAD вызывает диссоциацию нейронных сетей на субпопуляции нейронов, подавляя синхронную гиперактивность сетей, индуцированную ионами аммония // Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии. 2016. Т. 33. № 2. С. 150-158.
3. Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.I., Teplov I.Y., Tankanag A.V., Zinchenko V.P. To Break or to Brake Neuronal Network Accelerated by Ammonium Ions? // PLoS One. 2015. V. 10 (7). P. e0134145.
4. Надеев А.Д., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Авдонин П.В., Зинченко В.П., Гончаров Н.В. Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода // Цитология. 2015. Т. 57. № 12. С. 909-916.
5. Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Zinchenko V.P., Levin S.G., Shamsutdinova A.A., Godukhin O.V. Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons // Neurosci Lett. 2011. V. 496 (1). P. 11-4.
6. Снигирева А.В., Врублевская В.В., Скарга Ю.Ю., Моренков О.С. Роль мембрано-ассоциированных белков теплового шока HSP90 в миграции опухолевых клеток *in vitro* и участие клеточных гепарансульфатов в связывании этих белков на плазматической мембране // Биофизика. 2016. Т. 61. №2. С. 328-336.
7. Snigireva A.V., Vrublevskaia V.V., Skarga Y.Y., Evdokimovskaya Y.V., Morenkov O.S. Effect of heat shock protein 90 (Hsp90) on migration and invasion of human cancer cells *in vitro* // Bull Exp Biol Med. 2014. V. 157 (4). P. 476-8.
8. Kabanova N.V., Vassilevski A.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Korolkova Y.V., Pluzhnikov K.A., Romanov R.A., Grishin E.V., Kolesnikov S.S. Modulation of P2X3 receptors by spider toxins // Biochim Biophys Acta. 2012. V. 1818 (11). P. 2868-75.
9. Yurinskaya M., Zatsepina O.G., Vinokurov M.G., Bobkova N.V., Garbuz D.G., Morozov A.V., Kulikova D.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Funikov S.Y., Evgen'ev M.B. The

