

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

13 КВІ 2017

66/03-07

hlof

Кривдюк Ірини Володимирівни

„ERN1-залежна регуляція експресії генів родин GADD та TNF рецепторів у клітинах гліоми”, що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Дисертаційна робота Кривдюк Ірини Володимирівни є актуальним дослідженням, оскільки присвячена вона вивченню молекулярних механізмів регуляції проліферації клітин гліоми на рівні експресії генів пухлинних супресорів, що відносяться до родини GADD і суперродини TNF рецепторів та асоційованих з ними протеїнів у клітинах гліоми. Актуальність цієї роботи визначається саме тим, що гліоми є найбільш злоякісними пухлинами, які тяжко піддаються лікуванню, а досліджені Іриною Володимирівною гени можуть бути мішенню для розробки сучасних підходів до лікування та профілактики гліом.

Іриною Володимирівною вперше проведено масштабне дослідження по вивченню ролі основних генів родини GADD та суперродини TNF рецепторів в опосередкованому ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра) контролі процесів проліферації. Стрес ендоплазматичного ретикулума, як і гіпоксія, є важливим фактором росту злоякісних пухлин, він необхідний для адаптації пухлинних клітин до умов гіпоксії, розвитку резистентності пухлин до токсичної дії гіпоксії, а також нестачі поживних речовин, що свідчить про важливу роль цього стресу у регуляції процесів проліферації та виживання пухлинних клітин. Участь ERN1 у стресових реакціях клітини за умов пухлинного росту підтверджується тим фактом, що інгібування його активності має виражені протипухлинні ефекти, але детальні молекулярні механізми пригнічення пухлинного росту шляхом інгібування ERN1 поки що з'ясовані не повністю. У зв'язку з цим, тема

фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Дисертаційна робота Ірини Володимирівни викладена на 156 сторінках друкованого тексту. Вона складається із "Вступу", "Огляду літератури" (4 підрозділи), розділів „Матеріали та методи досліджень” (3 підрозділи) та „Результати досліджень” (4 підрозділи), а також „Обговорення результатів” (4 підрозділи), "Висновків" і "Списку використаних джерел літератури " (204 посилання). Ця робота містить 67 рисунків та 2 таблиці.

У "Вступі" Ірина Володимирівна чітко обґрунтувала тему своєї дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами і темами відділу, де була виконана робота, сформулювала мету і конкретні задачі досліджень, а також наукову новизну одержаних результатів та їх практичне значення. Розділ "Огляд літератури" охоплює велику кількість літературних даних по темі цієї дисертаційної роботи. Іриною Володимирівною проведений детальний аналіз наявних у літературі даних по обраному напрямку наукових досліджень та їх узагальнення. Велика увага автор приділила аналізу ролі стресу ендоплазматичного ретикулума, а також гіпоксії та ішемії, у рості злоякісних новоутворень, а також функціональному значенню основних протеїнів, що пригнічують ріст пухлин, зокрема представникам численної групи рецепторів фактора некрозу пухлин (TNFRSF) та асоційованих з ними протеїнів, їх ролі у регуляції проліферації і апоптозу пухлинних клітин. Один підрозділ присвячений групі генів зупинки росту і пошкодження ДНК (GADD), їх ролі у виживанні та контролі процесів проліферації і смерті клітин. Четвертий підрозділ огляду літератури присвячений обґрунтуванню запланованих досліджень. Автор чітко сформулювала питання, що не знайшли вирішення на даний момент і обґрунтувала необхідність виконання своєї дисертаційної роботи.

У другому розділі дисертаційної роботи детально описані методи досліджень, що були використані для виконання поставлених задач і

отримання результатів. У роботі , крім клітин U 87, були використані також 2 сублінії -клітини U 87 , що були трансфекзовані вектором рсDNA3.1 Детально описані методи культивування клітин, дослідження проліферації клітин, виділення РНК із них, спектрофотометричні методи визначення кількості РНК та їх спектральних характеристик, електрофоретичного аналізу нуклеїнових кислот та протеїнів, а також метод синтезу кДНК, методи полімеразної ланцюгової реакції, вестерн-блот аналізу та інші.

У третьому розділі наведені результати великого за об'ємом експериментального матеріалу. Проведеними дослідженнями Ірина Володимирівна продемонструвала, що у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим сигнальним ензимом ERN1 зменшується інтенсивність проліферації цих клітин гліоми і що гіпоксія посилює швидкість проліферації клітин гліоми, але пригнічення активності ERN1 знімає ефект гіпоксії. Нею також показано, що пригнічення активності сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 збільшує кількість апоптотичних клітин за умов нормоксії і що гіпоксія істотно не впливала на життєздатність цих клітин незалежно від функціональної активності ERN1.

Рівень експресії основних генів родини GADD виявився зниженим у клітинах гліоми з пригніченою активністю сигнального ензиму ERN1, за винятком генів *GADD45B* та *SESN1*, рівень експресії яких підвищувався, що вказує на їх причетність до зниження проліферації цих клітин. Встановлено, що зменшення рівня експресії мРНК GADD45A за цих умов супроводжується зниженням і протеїну, який кодується нею. Іриною Володимирівною також показано, що рівень експресії генів *GADD34*, *GADD45A*, *GADD45B* та *GADD153* у клітинах гліоми з ERN1 збільшується за гіпоксії, але при цьому гіпоксія не впливала на рівень експресії гена *SESN1*, і що пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1 істотно посилює вплив гіпоксії на експресію

генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD153* і індукує чутливість експресії гена *SESN1* до гіпоксії.

Таким чином, Ірина Володимирівна вперше продемонструвала, що пригнічення сигнального ензиму ERN1 змінює ефекти гіпоксії на експресію генів родини GADD, а це свідчить про принципово різні, не обумовлені HIF1, механізми гіпоксичної регуляції експресії окремих генів, які часто не узгоджуються з рівнем HIF1 альфа протеїну, оскільки його рівень збільшувався за гіпоксії в обох типах клітин. Автором також показано, що експресія більшості генів родини пухлинних супресорів GADD є чутливою до дефіциту глюкози та глутаміну і здебільшого залежить від активності сигнального ензиму ERN1.

Наукові результати, отримані Іриною Володимирівною, дозволяють визначити роль ключових регуляторних факторів суперродини TNF рецепторів у ланцюжку подій, що пов'язують пригнічення функціональної активності сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 з протипухлинними ефектами на рівні клітини, а також молекулярні механізми впливу гіпоксії і дефіциту глюкози чи глутаміну на ERN1, який є основним сигнальним шляхом відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулула.

Отримані Іриною Володимирівною дані мають вагомим практичне значення, оскільки знання молекулярних механізмів регуляції ключових факторів контролю програмованої смерті клітин необхідні для з'ясування механізмів контролю процесів апоптозу та проліферації пухлинних клітин і виявлення перспективних генів-мішеней для розробки нових шляхів пригнічення росту злоякісних новоутворень. Крім того, отримані автором результати вказують на взаємозв'язок сигнальної системи стресу ендоплазматичного ретикулула з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин у регуляції експресії генів, залучених до контролю процесів проліферації та апоптозу, а це необхідно

враховувати при розробці нових підходів до терапії злоякісних новоутворень. Експериментальний матеріал викладений послідовно, добре проаналізований та статистично опрацьований. В завершальній частині роботи (розділ 4 ,обговорення результатів) Кривдюк І.В. логічно підсумовує отримані результати.

Наукові положення дисертаційної роботи Ірини Володимирівни і зроблені нею висновки сформульовані чітко, достатньо відображені в опублікованих нею 15 наукових працях, із них 8 статей (6 експериментальних і 2 оглядові), що опубліковані у вітчизняних та закордонних фахових наукових виданнях, та 7 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і закордонних наукових конференцій і з'їздів, у тому числі і доповідь на конгресі FEBS.

Дисертація оформлена відповідно прийнятим вимогам до кандидатських дисертацій, а зміст автореферату є ідентичним основним її положенням. Результати експериментальних досліджень є достовірними, оскільки вони статистично опрацьовані і ретельно проаналізовані. У зв'язку з цим, принципових зауважень щодо дисертаційної роботи Ірини Володимирівни не маю.

Разом з тим, у процесі роботи над дисертацією виникли дискусійні питання, на які хотілося би почути думку Ірини Володимирівни:

1) Яка на вашу думку роль досліджених вами генів родин GADD та TNF рецепторів у контролі процесів проліферації та смерті клітин за злоякісного росту у порівнянні з іншими ростовими факторами?

2) Виявлені вами зміни в експресії основних генів родин GADD та TNF рецепторів за умов пригнічення ERN1 та гіпоксії у клітинах гліоми є унікальними, характерними лише для цих клітин гліоми, чи можуть мати місце і у клітинах інших видів злоякісних пухлин?

3) Чим можна пояснити, що досліджені вами гени родини GADD змінюються по-різному за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1 і зниження інтенсивності процесів проліферації?

4) Чому пригнічення ERN1 посилює експресію рецептора смерті 6 (DR6), але знижує експресію DR5?

Поставлені вище запитання не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи Ірини Володимирівни, яка успішно виконала всі поставлені наукові завдання для досягнення мети. Важливо відмітити, що результати роботи розширюють сучасні уявлення про механізми ERN1-опосередкованої регуляції процесів проліферації та апоптозу клітин на рівні експресії генів системи TNF рецепторів та GADD, а це може сприяти ідентифікації нових генів-мішеней для розробки сучасних підходів для пригнічення злоякісного росту, зокрема росту гліом.

Вважаю, що дисертаційна робота Кривдюк Ірини Володимирівни „ERN1-залежна регуляція експресії генів родин GADD та TNF рецепторів у клітинах гліоми ” за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів і можливістю їх практичного використання, а також достовірністю зроблених висновків, повністю відповідає вимогам пп. 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор Кривдюк Ірина Володимирівна заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.



Офіційний опонент,
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології і генетики,
доктор біологічних наук

Г. Д. Телегєєв

Телегєєв Г.Д.

Підпис *Телегєєв Г.Д.*
посвідчується
Зав. кабін. М. Мовчан