

**Голові спеціалізованої вченої ради
ДФ 26.240.002 у Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
провідному науковому співробітнику
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України, доктору біологічних наук
Даниловичу Юрію Володимировичу**

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук, професора, професора кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ

на дисертаційну роботу молодшого наукового співробітника
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

ЛУЗІНОЇ ОЛЬГИ ЯРОСЛАВІВНИ

«Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах
гліоми» представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 26.240.002

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

утворену наказом МОН від 19.07.21 №826

для розгляду та проведення разового захисту дисертації

на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертації. Актуальним напрямком сьогодення є вивчення біохімічних та молекулярних механізмів злякисного росту на рівні експресії важливих регуляторних генів. Онкологічні захворювання займають друге місце за проявом та рівнем смертності в світі, а гліоми є найбільш поширеними первинними пухлинами центральної нервової системи. Цей тип пухлин характеризується гетерогенністю, високим ступенем злякисності та

резистентністю до терапії, а відсутність ефективного лікування вказує на нагальну потребу більш детального вивчення механізмів росту пухлин та пошуку нових терапевтичних стратегій.

Дисертаційна робота Ольги Ярославівни «Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми» присвячена вивченню механізмів регуляції експресії саме тих генів, що кодують ключові регуляторні протеїни та ензими, які залучені до росту злоякісних пухлин в гіпоксичних умовах, за умови пригнічення IRE1, сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума. Надзвичайно актуальним у цій роботі є також виявлення міжгенних взаємодій шляхом дослідження експресії асоційованих з пухлинним ростом генів за умов сайленсінгу мРНК фосфорибозилтрансферази нікотинаміду (NAMPT), важливого регулятора проліферації, виживання та міграції клітин з метою пошуку нових стратегій терапії злоякісних гліом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася протягом 2016-2020 рр. у рамках проведення планових досліджень за такими бюджетними темами: “Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом”, № ДР 0116U001027 (2016–2020 рр.) та “Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів”, № ДР 0117U002624 (2017–2021 рр.), підрозділ теми “Роль ендоплазматичного ретикулума та мітохондрій у молекулярних механізмах інтегральної регуляції процесів проліферації”.

Наукова новизна одержаних результатів. В дисертаційній роботі вперше встановлено, що рівень експресії низки генів *NAMPT*, *ATF6*, *ATF3*, *PERK*, *BRCA1*, *BIRC5*, *COL6A1*, *DEK*, *GLO1*, *RAB5A* та *TGM2*, які кодують різні за своєю функцією протеїни, суттєво залежить від стресу ендоплазматичного ретикулума, а саме від функціонування сенсорно-сигнального шляху IRE1/ERN опосередкованого протеїном IRE1 (inositol-requiring enzyme 1, ензим, залежний від інозитулу 1), який є найбільш консервативним сенсорно-сигнальним протеїном, що активується у відповідь на стрес, причому у генно-

специфічний спосіб. Більше того, дисертанткою продемонстровано, що пригнічення рівня експресії гена *NAMPT* відбувається опосередковано ендорибонуклеазою активністю IRE1, і, імовірно, обумовлено як транскрипційними, так і пост-транскрипційними модифікаціями. За даними біоінформатичного аналізу 3'кінцевих некодуючих послідовностей мРНК *NAMPT* виявлено 2 сайти зв'язування мікроРНК miR-182-5p. Як результат було встановлено, що за умов пригнічення функціональної активності сигнального протеїну IRE1 рівень експресії цієї мікроРНК підвищується у порівнянні з контрольними клітинами гліоми лінії U87, що є подібним до культивованих клітин нормальних астроцитів людини (лінія NHA/TS), в яких рівень мікроРНК miR-182-5p є високим у порівнянні з клітинами гліоми. Все це переконливо свідчить про наявність і пост-транскрипційних механізмів регуляції мРНК *NAMPT*.

Одним із завдань дисертаційної роботи було визначення впливу гіпоксії на експресію низки генів. Було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії зростає експресія мРНК *COL6A1*, *TGM2* і *PERK*, експресія мРНК *ATF6*, *DEK*, *GLO1* та *GNPDA1*, а також *BRCA1*, навпаки, знижується за даних умов. Це вказує на наявність складних механізмів гіпоксичної регуляції експресії генів і причетність до них IRE1, сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. Отримані дані поглиблюють розуміння молекулярних основ росту злоякісних пухлин та розвитку резистентності до токсичної дії гіпоксії. Дисертанткою продемонстровано також наявність різної чутливості експресії більшості досліджених генів у клітинах гліоми до умов дефіциту глутаміну, надзвичайно важливого фактора росту гліом, і її залежність від функціональної активності IRE1-залежного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума.

Надзвичайно важливим розділом цієї дисертаційної роботи є результати вивчення сайленсінгу *NAMPT* як таргетного гена терапевтичного спрямування і виявлення негативних наслідків зниження *NAMPT* на рівні експресії низки генів, що були попередньо досліджені. В результаті дослідження отримані принципово нові результати, які вказують на порушення функціональної цілісності геному за

умов сайленсінгу лише однієї мРНК, а саме мРНК NAMPT, на наявність тісних міжгенних взаємодій і репрограмування геному для компенсації дефіциту NAMPT, цього надзвичайно важливого апотеїну.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає у вивченні молекулярних механізмів, які лежать в основі зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми, опосередкованого пригніченням сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулула. Ці дані слугуватимуть підґрунтям для створення принципово нових стратегій системної терапії гліом, які б оминули побічні ефекти таргетної терапії. Отримані результати були використані у лекціях по спецкурсам «Конструювання генів» і «Механізми онкогенезу» для магістрів КНУ імені Тараса Шевченка та Національного університету «Києво-Могилянська академія», а також в курсі лекцій для аспірантів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Висвітлення результатів у наукових публікаціях. Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані в 5 наукових статтях в іноземних та вітчизняних фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, три із яких представлені в базі даних Scopus, і в 10 тезах доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях і конгресах, включаючи Parnas конференцію.

Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності. У дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.

Дисертація Ольги Ярославівни Лузіної написана за загальноприйнятою формою, що відповідає вимогам МОН України. Робота викладена на 129 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури, що включає 228 посилань, більшість яких датовані в останні 5 років. Робота містить 50 рисунків та 3 таблиці.

Структура дисертації логічно побудована, а це сприяє розкриттю змісту теми дослідження і виконанню поставлених завдань.

В розділі **Огляд літератури** Ольга Ярославівна висвітила сучасний стан проблеми, детально охарактеризувала гени, що кодуєть ключові фактори та ензими, які залучені у контроль процесів проліферації і апоптозу за умов злякисного росту та особливості IRE1-опосередкованого сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. При цьому авторкою було детально проаналізовано досить велику кількість нових, переважно закордонних, публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дисертації.

До цього розділу є незначне зауваження: зазвичай, аналізуючи дані світової літератури варто вказувати, що з теми дисертаційної роботи є невизначеним, які питання є спірними і потребують додаткових досліджень, що і стало темою, метою та завданнями даної дисертаційної роботи.

Розділ **Матеріали та методи дослідження** побудовано з двох основних блоків експериментальних досліджень: біохімічного та молекулярно-біологічного. Методичні прийоми та підходи детально описані, надано послідовності праймерів до досліджуваних генів, детально описані методи ПЛР-діагностики, надано методи статистичного аналізу.

Проте є запитання щодо використаних клітинної лінії гліоми U87 та її субліній, наскільки заявлені властивості даних клітин були стабільними та відтворювались на різних пасажах їх культивування? Як ці властивості відворювались після кріоконсервування клітин і чи досліджували Ви ці властивості в кожній новій серії експериментів?

Розділ **Результати дослідження** складається із 4 підрозділів та містить детальну інформацію щодо експресії різних генів асоційованих з IRE1-опосередкованим сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулума. За різних умов культивування клітин гліоми та її субліній досліджували вплив на рівень експресії ключових генів прогресії/регресії клітин гліоми.

В підрозділі **3.1.** наводяться дані щодо рівня експресії мікроРНК *miR-182* в умовно нормальній тканині головного мозку (Norm.) та гліобlastомах (Glioma) людини, у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS та клітинах гліоми лінії

U87, а також у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector), та сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1).

Однак, в матеріалах і методах не описано, яким чином відбувався забір матеріалу з тканини умовно нормальної та гліобластом людини? Що це за дані наведено на рис. 3.4?

Було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 зі зниженим рівнем мРНК та протеїну NAMPT в результаті дії специфічної до NAMPT siRNA істотно знижується рівень експресії маркера проліферації Ki-67 (MKI67) та гена PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Також виявлено, що зниження рівня мРНК та протеїну NAMPT асоціюється із пригніченням інтенсивності проліферації клітин гліоми за умов сайленсінгу NAMPT.

А чи є відомості щодо нокдауну гену NAMPT і яким чином це впливає на пухлиноасоційовані гени та пов'язані з цим процеси проліферації та міграції пухлинних клітин?

І на Вашу думку, які основні механізми змін в експресії великої кількості генів за умов сайленсінгу NAMPT?

Ви стверджуєте, що знижується рівень експресії пропроліферативних генів Ki-67 (MKI67), PCNA, що пов'язано з пригніченням проліферації клітин гліоми. Чи перевіряли Ви даний ефект іншими підходами, наприклад в МТТ-тесті? Можливо перевіряли ефекти пригнічення функціонування гену NAMPT та модифікації шляху сигнального протеїну IRE1 на клітинний цикл, рівень апоптозу, некрозу чи мітозу іншими загальноприйнятими методами? І, загалом, чи впливали зміни в експресії різних генів на фенотипові ознаки культивованих клітин?

Оскільки, більшість пухлин прогресують в умовах гіпоксії і зміни метаболізму (енергетичний шлях за рахунок гліколізу), то важливим етапом дослідження є визначення механізмів функціонування клітин саме за гіпоксичних умов. В результаті проведених експериментальних досліджень було виявлено підвищення рівня основного маркерного протеїну гіпоксія-індуцибельного фактору (HIF-1 α) як у контрольних клітинах гліоми, так і в

клітинах з повним пригніченням функціональної активності IRE1. Також було визначено ефекти гіпоксичних умов культивування лінії клітин U87 та її субліній на експресію низки генів - регуляторів виживання та апоптозу, зокрема, *ATF6*, *PERK (EIF2AK)*, *BRCA1*, *DEK*, *GLO1*, *BCL2L1*, *HOMER3* і *GNPDA1*; генів, продукти яких асоційовані з інвазією, міграцією та ангиогенезом - *ADGRE5*, *TGM2*, *COL6A1*. Як контроль було використано клітини гліоми лінії U87, трансфіковані пустим вектором, а також генетично модифікований варіант цієї лінії клітин з повним пригніченням функціональної активності ензиму IRE1. Було показано, що в умовах гіпоксії експресія більшості досліджених генів залежала від функціональної активності IRE1. Так, рівень експресії мРНК *PERK*, *TGM2* і *COL6A1* зростав, тоді як рівень експресії *ATF6*, *BRCA1*, *DEK*, *GLO1* та *GNPDA1*- знижувався у контрольних клітинах гліоми. Пригнічення IRE1 модифікувало ефект гіпоксії щодо експресії більшості генів: повністю пригнічує гіпоксичну регуляцію експресії генів *DEK*, *TGM2*, *GNPDA1* і *GLO1* змінює чутливість експресії генів *HOMER3*, *BCL2L1* і *ADGRE5* до умов нестачі кисню, послаблює експресію генів – *COL6A1*, *PERK (EIF2AK)* та модифікує гіпоксичний ефект на експресію гена *ATF6*. Щодо даного підрозділу виникає ряд запитань та зауважень:

Оскільки ефекти гіпоксії опосередковуються транскрипційним фактором HIF, то на Вашу думку, шановна, Ольга Ярославівна, які молекулярні механізми лежать в основі залежності гіпоксичної регуляції від стресу ендоплазматичного ретикулула, зокрема ERN1?

Яке функціональне значення залежності гіпоксичної регуляції експресії генів, що опосередковують проліферацію пухлинних клітин гліобластоми, від активності сигнального протеїну IRE1?

Також невелике чисто технічне запитання:- яким чином Ви створювали умови гіпоксії? В методах наведено лише посилання на статтю (Minchenko DO, Kubaichuk KI, Ratushna OO, Komisarenko S V., Minchenko OH. The vascular endothelial growth factor genes expression in glioma U87 cells is dependent from ERN1 signaling enzyme function. Adv Biol Chem. 2012. Vol. 2, N 2), проте це надзвичайно важливий розділ Вашого дисертаційного дослідження, то варто

було б детально розписати цей методичний прийом.

Також вираз «У нормальних клітинах гліоми...» є недоречним, варто було б перефразувати «У клітинах гліоми вихідної лінії U87...»

Важливим етапом дослідження метаболізму пухлинних клітин та вивчення молекулярно-біохімічних механізмів метаболічного репрограмування є визначення ролі глутаміну за гіпоксичних умов функціонування клітин. Відомо, що глутаміноліз є важливим чинником регуляції клітинного циклу за пухлинного росту, оскільки глутамін стимулює споживання глюкози пухлинними клітинами, тоді як блокада метаболізму глутаміну знижує поглинання глюкози і відповідно, може пригнічувати проліферацію пухлинних клітин. У підрозділі 3.4 детально досліджується виключення сенсорно-сигнального протеїну IRE1/ERN1, що є фактором чутливості експресії генів *PERK*, *ATF6*, *ADGER5*, *BRCA1*, *DEK*, *COL6A1*, *RAB5C*, *BIRC5* та *GNPDA1* до умов дефіциту глутаміну в клітинах гліоми. Отримані дані демонструють IRE1-опосередковану регуляцію метаболізму в пухлинних клітинах за рахунок модифікації впливу дефіциту глутаміну на експресію більшості досліджених генів. До даного підрозділу виникло ряд запитань:

Оскільки основною метою представленої дисертаційної роботи було виявлення міжгенних взаємодій у клітинах гліоми шляхом дослідження експресії генів за умов пригнічення сигнального протеїну IRE1, а також сайленсінгу мРНК NAMPT, чи визначали Ви вплив дефіциту глутаміну та пригнічення функціонування мРНК NAMPT на експресію основних груп досліджуваних генів, а також на основні показники функціональних проявів клітин гліобластоми таких як проліферація та клітинний цикл?

А чи відомі Вам інші гліколітичні субстрати для пухлинних клітин в умовах гіпоксії?

У розділі «Обговорення результатів» зроблений детальний аналіз отриманих результатів і проведено їх обговорення. На узагальнюючій схемі (рис.4.1) та в таблицях (4.1-4.3) наведено зміни в експресії генів, що відображають репрограмування функціонального стану клітини за умов сайленсінгу мРНК NAMPT, а також повного (як кінази, так і ендорибонуклеази)

пригнічення IRE1 (dnIRE1). Також автором, з огляду, на дані інших науковців та власні результати детально обговорюються питання щодо побічних ефектів таргетної генної терапії, пов'язаної з пригніченням та повним виключенням функціонування певних генів, які задіяні в прогресуванні новоутворень. Автором зазначається, що розуміння механізмів регулювання на генному рівні та репрограмування в пухлинних клітинах за умов зміни рівня експресії чи активності IRE1 і NAMPT має надзвичайно важливе значення для оцінки та прогнозування наслідків таргетної терапії в розробці сучасних технологій лікування новоутворень, зокрема, гліобластом. Виникає слушне зауваження до автора: Шановна Ольга Ярославівна, скажіть, *будь ласка, Ви як науковець чим можете пояснити захоплення таргетною терапією? І чи не несе даний тип терапії додаткових загроз та побічних ефектів при лікуванні новоутворень? І що Ви думаєте щодо метаболічного фенотипу пухлинних клітин та його інверсії як засобу протипухлинної терапії?*

Висновки, які логічно випливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і ясно, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах. Проте деякі із них потрібно було б уточнити, зокрема Висновок 5. «Показано, що пригнічення сигнального протеїну IRE1 модифікує ефект дефіциту глутаміну на експресію більшості досліджених генів і це вказує на опосередковану стресом регуляцію метаболізму за умов пригнічення IRE1» - *варто було б вказати щодо яких генів йде мова, та «глутамін-опосередкованого метаболізму».*

Наукові положення, наведені в дисертації Лузіної Ольги Ярославівни, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу експериментальних досліджень, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики (протокол №2 засідання комісії з біоетики і біобезпеки Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України від 13 травня 2021 року).

Дисертаційна робота Ольги Ярославівни заслуговує на позитивну оцінку, незважаючи на ряд запитань та зауважень, які виникли в процесі

рецензування роботи, і, загалом, не знижують наукової цінності роботи, оскільки вони стосуються головним чином інтерпретації її результатів.

Висновок. Дисертаційна робота Лузіної Ольги Ярославівни “Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми” є завершеною науковою працею, яка розкриває молекулярні механізми стрес-залежної регуляції експресії ключових генів контролю процесів проліферації та апоптозу за злякисного росту, зокрема у клітинах гліоми. Актуальність теми, новизна дослідження, теоретичне і практичне значення отриманих результатів, а також сучасний методичний рівень проведених досліджень, свідчать про високі наукові досягнення здобувачки, а дисертаційна робота Лузіної Ольги Ярославівни “Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми” повністю відповідає вимогам пп. 10, 11 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 №167 (у редакції постанови КМУ від 09.06.2021 № 608). Тому вважаю, що здобувачка заслуговує на присудження їй ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

д.б.н., проф.,
проф. кафедри зоології та екології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Гарманчук Л.В.

ЛІАНИС ЗАС. І. О. О.
ВЧЕРНІ СЕКРЕТАР НАЧ
КАРАДУЛЬНА Н. В.
03.09.2021р.

