

**ВІДГУК**

15 БЕР 2017

Вх. № 63/03-07

**офіційного опонента на дисертаційну роботу**

**Цимбал Дарії Олександрівни**

„Роль сигнального ензиму IRE1 у регуляції експресії про- та анти-проліферативних генів у клітинах гліоми”, що представлена до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Дисертаційна робота Цимбал Дарії Олександрівни присвячена вивченню змін в експресії низки генів, білкові продукти яких залучені до різних аспектів регуляції пухлинного росту, у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності IRE1, найбільш консервативного ефектора сигнального шляху відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулула. Активація цього сигнального шляху є важливим фактором виживання пухлинних клітин, а його інактивація знижує проліферацію клітин та ріст гліом, які є найбільш агресивними злоякісними пухлинами і тяжко піддаються лікуванню. А тому пізнання молекулярних механізмів, що лежать в основі пригнічення росту гліом за умов пригнічення активності IRE1, і визначають актуальність цієї роботи. Більше того, досліджені Дарією Олександрівною гени і фактори, що кодуються ними, можуть бути мішенню для розробки сучасних підходів до лікування та профілактики гліом.

Ця робота представляє собою масштабне дослідження присвячене вивченню ролі генів про-проліферативних та анти-проліферативних факторів в опосередкованому IRE1 контролі процесів проліферації клітин та росту пухлин. Стрес ендоплазматичного ретикулула відіграє важливу роль у регуляції проліферації та виживанні пухлинних клітин, оскільки він причетний до репрограмування геному на посилену проліферацію клітин та підвищений рівень метаболічних процесів за умов гіпоксії та нестачі поживних речовин, що має місце у злоякісних пухлинах. І хоча уже відомо, що інгібування активності IRE1 має виражені протипухлинні ефекти, молекулярні механізми цього явища поки що не до кінця з'ясовані. У зв'язку

з цим, тема дисертаційної роботи Дарії Олександрівни безсумнівно є актуальною як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Дисертаційна робота Дарії Олександрівни Цимбал викладена на 167 сторінках друкованого тексту та складається із “Вступу”, “Огляду літератури” (7 підрозділів), розділів „Матеріали та методи досліджень” та „Результати досліджень” (5 підрозділів), а також „Обговорення результатів” (4 підрозділи), “Висновків” і “Списку використаних літературних джерел” (209 посилань). Робота містить 69 рисунків та 3 таблиці.

У “Вступі” чітко обґрунтована тема дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами і темами, сформульована мета і конкретні задачі досліджень, а також наукова новизна одержаних результатів та їх практичне значення. Розділ “Огляд літератури” охоплює велику кількість літературних даних по темі дисертаційної роботи, причому Дарія Олександрівна провела не лише детальний аналіз наявних в літературі даних по обраному напрямку наукових досліджень, а і їх узагальнення. Вона проаналізувала основні ефекти факторів росту та пухлинних супресорів на рівні клітини, механізми регуляції процесів проліферації у злоякісних пухлинах та особливості цієї регуляції у гліомах.

Особлива увага була приділена ключовій ролі транскрипційних факторів та пухлинних супресорів у регуляції процесів проліферації за пухлинного росту. Детально проаналізована роль гіпоксії у рості злоякісних пухлин, а також значення метаболізму глутаміну та глюкози у контролі процесів проліферації клітин гліоми. Оскільки стрес ендоплазматичного ретикулума відіграє важливу роль у регуляції процесів проліферації та виживання пухлинних клітин, репрограмує геном на посилену проліферацію клітин, Дарія Олександрівна розглянула основні сенсорно-сигнальні шляхи цього стресу та їх роль у рості злоякісних пухлин, приділивши особливу увагу IRE1-залежному шляху. Окремий підрозділ присвячений взаємодії генів у механізмах регуляції процесів проліферації пухлинних клітин. Дисертанткою чітко сформульована низка питань, вивчення яких допоможе

формуванню більш повного розуміння молекулярних механізмів пухлинного росту, зокрема гліом. Крім того, обґрунтована необхідність виконання цієї дисертаційної роботи, кінцева мета якої спрямована на пошук нових мішеней протипухлинного росту.

Другий розділ дисертаційної роботи присвячений методам досліджень, що були використані в даній роботі. Варто відмітити, що вони повністю відповідають поставленим задачам. Детально описані методи виділення РНК із клітин; спектрофотометричні методи визначення кількості РНК; електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот; метод синтезу комплементарних ДНК; методи полімеразної ланцюгової реакції та олігонуклеотидні праймери, використані в роботі; вестерн-блот аналіз; виділення плазмідних ДНК; трансформація компетентних клітин та транз'єнтна трансфекція пухлинних клітин; аналіз HSE-залежної транскрипції методом люциферазного репортера та інші. Обрані методи статистичної аналізу є адекватним для встановлення вірогідної значущості отриманих результатів.

У розділі „Результати досліджень” Дарія Олександрівна наводить дані великого за об'ємом експериментального матеріалу. Проведеними дослідженнями вона продемонструвала, що експресія мРНК генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* та *MYRL2* у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1. Виявлено також зниження рівня експресії мРНК про-проліферативних транскрипційних факторів за умов пригнічення IRE1. Більше того, показано, що регуляція експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *FOXF1*, *EPAS1*, *CD24* та *MYRL2* залежить як від кіназної, так і від ендорибонуклеазної активності IRE1, а генів *E2F8*, *MEST*, *KRT18* та *IL13RA2* – переважно залежить від ендорибонуклеазної активності IRE1, тоді як експресія гена *ING1* – лише від кіназної активності IRE1. У випадку генів *FOXF1* та *ING2* виявлені

протилежно напрямлені зміни за умов повного та часткового пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

Дисертанткою було також встановлено, що гіпоксія посилює експресію генів транскрипційних факторів HOXC6, ATF3, EPAS1 і SNAI2, пухлинних супресорів MYL9/MYRL2, ING1 та ING2, а також факторів CD24, IL13RA2 та MEST у контрольних (з інтактним ERN1) клітинах гліоми. Нею вперше показано, що пригнічення ензиму ERN1 модифікує ефекти гіпоксії на експресію частини досліджених генів, а це свідчить про різні механізми гіпоксичної регуляції експресії генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів. Так, пригнічення IRE1 у клітинах гліоми усуває гіпоксичну регуляцію експресії генів *HOXC6*, *CD24*, *ING1*, *ING2* та *MYL9*, послаблює вплив гіпоксії на експресію генів *SNAI2* та *MEST* і посилює – на гени *ATF3*, *EPAS1* та *IL13RA2*. Разом з тим, було показано, що гіпоксія знижувала рівень експресії генів *E2F8*, *TBX2*, *MYBL1*, *MYBL2*, *KRT18* та *TCF8* і не впливала на експресію генів *FOXF1*, *TBX3*, *MAZ* та *TCF3* у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення ензиматичних активностей IRE1 модифікувало вплив гіпоксії на експресію досліджених генів, за винятком фактора MAZ. Особливої уваги заслуговує той факт, що у жодному із випадків вплив гіпоксії не нівелює ефекту пригнічення IRE1 на експресію досліджуваних генів у клітинах гліоми.

Отримані Дарією Олександрівною результати дозволяють визначити роль ключових транскрипційних факторів та пухлинних супресорів у ланцюжку подій, що пов'язують пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1 та протипухлинні ефекти на рівні клітини, а також молекулярні механізми впливу гіпоксії і дефіциту глюкози або глутаміну на IRE1, основну сигнальну систему відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулума.

Отримані нею результати мають і практичне значення, оскільки детальне вивчення молекулярних механізмів регуляції ключових транскрипційних факторів та пухлинних супресорів необхідно для з'ясування механізмів

контролю процесів проліферації і виявлення перспективних генів-мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин. Більше того, отримані результати вказують на взаємозв'язок сигнальної системи стресу ендоплазматичного ретикулума з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин у регуляції експресії генів, залучених до контролю процесів проліферації, що необхідно враховувати при розробці нових підходів до терапії злоякісних новоутворень. Експериментальний матеріал послідовно викладений, добре проаналізований та статистично опрацьований.

Наукові положення дисертаційної роботи Дарії Олександрівни і зроблені нею висновки чітко сформульовані у дисертації, досить повно відображені в опублікованих нею 16 наукових працях, із них 8 статей, опублікованих у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій та конгресів.

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 вище сказаним, принципових зауважень щодо дисертаційної роботи Дарії Олександрівни Цимбал немає.

Побажання до оформлення результатів:

- 1) в розділі матеріали і методи, підрозділ 2.2.2, було б доцільно дати перелік використаних праймерів у вигляді таблиці;
- 2) при оформленні результатів вестерн блот аналізу (рис.3.2, 3.4, 3.7, 3.10) необхідно було надати маркер молекулярної маси, або зазначити молекулярну масу досліджуваного протеїну;
- 3) було б не зайвим, при викладенні отриманих результатів, надати інформацію щодо проліферативного рівня досліджуваних клітин за

умов пригнічення ендорибонуклеазної активності IRE1/ERN1, стресу ЕПР за дії тунікаміцину тощо;

4) в дисертації зустрічаються невдалі переклади з інших мов.

Також, у процесі роботи над дисертацією виникло декілька дискусійних питань, на які хотілося б почути думку Дарії Олександрівни:

1) Як Ви можете пояснити протилежні зміни в експресії деяких генів, зокрема FOXF1, MYBL2, ING2, за умов виключення як кіназної так і ендорибонуклеазної активності IRE1 і лише ендорибонуклеазної?

2) Вами досліджена експресія низки пухлинних супресорів у клітинах гліоми. В якій мірі ці дані є специфічними для гліом, наскільки вони віддзеркалюють події у клітинах інших видів злоякісних пухлин?

3) Ви створили і частково дослідили нові конструкції IRE1. Що принципово нового можуть дати ці конструкції у розумінні функціонального значення IRE1?

Поставлені вище запитання не впливають на загальну високу оцінку роботи Дарії Олександрівни, яка успішно виконала всі наукові завдання для досягнення поставленої мети. Важливо відмітити, що результати роботи розширюють сучасні уявлення про механізми IRE1-опосередкованої регуляції процесів проліферації на рівні експресії про- та анти-проліферативних генів, а це може сприяти ідентифікації нових генів-мішеней для розробки сучасних підходів до пригнічення злоякісного росту.

Вважаю, що дисертаційна робота Цимбал Дарії Олександрівни „Роль сигнального ензиму IRE1 у регуляції експресії про- та анти-проліферативних генів у клітинах гліоми” за своєю актуальністю, науковою новизною отриманих результатів і можливістю їх практичного використання, глибиною і обсягом досліджень, змістом та оформленням, а також достовірністю зроблених висновків повністю відповідає вимогам пп. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 (зі змінами), а її автор Цимбал

