

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. директора Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України,
академік НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Сергій КОСТЕРІН
протокол № 1 від 04.03.2025 р.



ВІСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне
значення результатів дисертації

Мирослави СЛЮСАР

“Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину
у клітинах гліоми”

поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії
в галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

1. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Актуальність теми цієї роботи в тому, що гліобластоми є найбільш злоякісними і досить поширеними первинними пухлинами головного мозку, які надто тяжко піддаються лікуванню та характеризуються короткою тривалістю життя пацієнтів. А тому, з'ясування молекулярних основ патогенезу гліобластом, ролі синтезу серину в їх рості та пошук шляхів пригнічення росту цих агресивних пухлин є важливим і актуальним для покращення існуючих та створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії.

2. Мета та завдання дисертації. Метою роботи було дослідити експресію генів синтезу серину у контрольних клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами, а також у генетично модифікованих клітинах гліобластоми з пригніченою функціональною активністю ERN1 та за дії гіпоксії і дефіциту глутаміну чи глюкози.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Визначити рівень експресії генів синтезу серину у контрольних клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами людини.

2. Дослідити вплив пригнічення функціональної активності ERN1 у клітинах гліобластоми на рівень експресії генів синтезу серину.

3. Вивчити вплив гіпоксії на рівень експресії генів, які контролюють синтез серину, у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення сигнального протеїну ERN1.

4. Дослідити вплив дефіциту глутаміну і глюкози на експресію генів синтезу серину у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення активності ERN1.

5. Провести біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів синтезу серину на сайти зв'язування HIF і XBP1s та 3'-нетранслюємих ділянок мРНК цих транскрипційних факторів на наявність сайтів зв'язування мікроРНК. Дослідити вплив пригнічення активності ERN1 на експресію мікроРНК.

3. Наукова новизна одержаних результатів. Вперше була виявлена залежність рівня експресії генів, що контролюють синтез і метаболізм серину, від пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. Встановлено, що виявлені зміни в експресії досліджених генів у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG були гено-специфічними, причому для більшості генів були різними у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 і клітинах без ендорибонуклеази ERN1. Виявлене нами зниження експресії генів, які контролюють синтез серину, у клітинах з пригніченою функціональною активністю ERN1 добре узгоджуються з їх зниженим проліферативним потенціалом, оскільки посилення експресії ензимів синтезу серину є важливою умовою посиленого росту злоякісних пухлин. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеази ERN1 у регуляції експресії гена *ATF4*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 рівень експресії цього гена істотно не відрізнявся за величиною. Вперше показано, що саме протеїнкіназна активність ERN1 є ключовим регулятором експресії генів *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2*, оскільки інгібування ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну істотно не впливало на рівень їх експресії, і лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей протеїну ERN1 (протеїнкіназної і ендорибонуклеазної) рівень експресії цих генів змінювався.

Вперше показано, що експресія всіх генів, що контролюють синтез та метаболізм серину, є чутливою до гіпоксії у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих порожнім вектором, причому зміни рівня їх експресії були різними як за величиною ефекту, так і за напрямком змін для всіх цих генів. Встановлено також, що пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 змінює чутливість генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* та *ATF4* до гіпоксії, а це свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів. Ці результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин, у тому числі і клітин гліобластоми, до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Принципово нові результати були отримані при вивченні чутливості експресії генів, які забезпечують синтез і метаболізм серину, до дефіциту як глутаміну, так і глюкози, і що пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 посилює чутливість усіх генів до цих експериментальних умов за

винятком *SHMT1*. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

4. Теоретичне значення одержаних результатів. Теоретичні положення, сформульовані за результатами проведених досліджень та опрацювання інших теоретичних і практичних даних, розширюють існуючі уявлення про роль і молекулярні механізми пригнічення експресії генів синтезу серину у зниженні проліферативного потенціалу клітин гліобластоми за різних умов нокдауну ERN1, основного сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, а також про важливу роль цього сигнального протеїну у гіпоксичній регуляції експресії генів.

5. Практичне значення одержаних результатів полягає у виявленні ролі протеїнази ERN1 та ендорибонуклеазної активності ERN1 у регуляції експресії генів, причетних до синтезу і метаболізму серину, пригнічення яких є причетним до зниження проліферативного потенціалу клітин гліоми, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК *PSAT1*, *PSPH* і *SHMT1* на пост-трансляційному рівні і можуть бути потенційними мішенями для пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Виявлений нами ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до гіпоксії є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за стресу ендоплазматичного ретикулума, що має важливе значення при розробці нових підходів до лікування злоякісних новоутворень.

6. Особистий внесок здобувача. Представлена дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2022–2025 рр. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження по вивченню рівня експресії генів, причетних до синтезу серину, у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і його залежності від типу пригнічення ензиматичних активностей протеїну ERN1. Авторкою були проведені дослідження по виявленню можливої ролі ERN1 сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у гіпоксичній регуляції експресії генів, відповідальних за синтез серину, та за умов дефіциту глюкози і глутаміну, а також здійснено біоінформаційний аналіз промоторів досліджених генів на наявність сайтів зв'язування транскрипційних факторів HIF та HBP1s, статистичну обробку отриманих результатів і їх узагальнення. Студентка Анастасія ЧЕРЕДНИЧЕНКО допомагала у проведенні деяких досліджень. Окремі дослідження по визначенню рівня експресії певних генів проводилися за участі к.м.н. Дмитра МІНЧЕНКА і доктора філософії Олени ХІТИ. Олег ГАЛКІН, Дарія ЦИМБАЛ, Ольга ЛУЗІНА, Дмитро МІНЧЕНКО, Юлія ВІЛЕЦЬКА, Ольга РУДНИЦЬКА, Сергій ДАНИЛОВСЬКИЙ, Людмила ЛЕВАДНА, Оксана РАТУШНА та Євген ХІХЛО приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статей до друку. Планування роботи,

розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Олександра МІНЧЕНКА.

7. Публікації результатів роботи, їх обговорення. Основні результати дисертації знайшли відображення у 4-ох друкованих працях, які опубліковані у періодичних наукових виданнях, віднесених до першого-третього квартилів (Q1-Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Report. Аналіз внеску автора у публікації з питань, висвітлених у дисертації, показав, що внесок Мирослави СЛЮСАР є вирішальним, зокрема у працях:

1. **Sliusar MY**, Minchenko DO, Khita OO, Tsymbal DO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Ratushna OO, Minchenko OH. Hypoxia controls the expression of genes responsible for serine synthesis in U87MG cells on ERN1-dependent manner. *Endocr Regul*, 2023, 57(4): 252-261. doi:10.2478/enr-2023-0028. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті).* **Scopus i PubMed (Q3)**

2. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khikhlo YP, Halkin OV, Viletska YM, Khita OO, Minchenko DO. Knockdown of ERN1 disturbs the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and related genes in glioblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 759: 110104. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110104>. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті).* **Scopus, Web of Sciences (Q1)**

3. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khita OO, Minchenko DO, Viletska YM, Halkin OV, Levadna LO, Cherednychenko AA, Khikhlo YP. Inhibition of signaling protein ERN1 increases the sensitivity of serine synthesis gene expressions to glucose and glutamine deprivations in U87MG glioblastoma cells. *Endocr Regul*, 2024, 58(1): 91-100. doi:10.2478/enr-2024-0010. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка даних та участь у написанні статті).* **Scopus i PubMed (Q3)**

4. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khita OO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Minchenko DO. Endoplasmic reticulum stress-dependent regulation of the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. *Endocr Regul*, 2024, 58(2): 1-9. doi:10.2478/enr-2024-001x. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена SHMT2 за умов пригнічення ERN1, гіпоксії і дефіциту глутаміну чи глюкози, обробка даних та участь у написанні статті).* **Scopus i PubMed (Q3)**

8. Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на міжнародних та вітчизняних конференціях та конгресі: The 5th and 6th Int. Sci. Conf. "Current Problems Biochem., Cell Biol. Physiol", Dnipro, October, 2022 і 2024; The 47th FEBS Congress, July 8-12, 2023, Tours, France; 1-st

International meeting of the Enlight Cancer network "Enlight Cancer Days", September 28-29, 2023, BRIC, Bordeaux University, Talence, France, 2023; та XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБіГ НАН України, 21-22 травня, 2024, Київ.

9. Інформація щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень. Дослідження були проведені на культурах клітин гліобластоми лінії U87MG. Культура клітин гліобластоми мозку людини лінії U87MG з вектором pcDNA3.1 та домінант-негативною конструкцією на основі цього вектора, що містила кДНК протеїну ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1) були надані професором М. Моеннер (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу, Університет Бордо 1, Франція). Робота проводилася з дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки відповідно до вказівок та рекомендацій Гельсінської декларації (1975) з доповненнями від 2000 та 2008 років для роботи з використанням людського матеріалу. Це підтверджено експертним рішенням Комісії з біологічної безпеки та біоетики Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (протокол № 1, від 13 лютого 2025 року).

Таким чином, за результатами публічної презентації Мирославою СЛЮСАР наукових результатів дисертації «Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину у клітинах гліоми» та її обговорення на розширеному засіданні Випускової кафедри «Біологія» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та наукового семінару «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України ухвалили:

1. Вважати, що дисертація Мирослави СЛЮСАР на тему «Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину у клітинах гліоми» є завершеною науковою працею та відповідає спеціальності 091 «Біологія»

2. Вважати, що дисертація Мирослави СЛЮСАР відповідає «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого постановою №261 Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року та «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора

філософії» (пп. 6, 7, 8), затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №44 від 12 січня 2022 р.

3. Рекомендувати дисертацію Мирослави СЛЮСАР на тему «Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину у клітинах гліюми» до захисту на засіданні разової спеціалізованої вченої ради за спеціальністю 091 «Біологія».

13.03.2025 р.

Головуючий, заступник директора
з наукової роботи
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
академік НАН України,
д.б.н., професор

Сергій КОСТЕРІН

Завідувач Випускної кафедри
«Біологія» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
д.б.н., с.н.с.

Лідія БАБІЧ

Секретар засідання, науковий співробітник
відділу молекулярної біології
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
д-р філ.

Ольга РУДНИЦЬКА