

Голові спеціалізованої Вченої ради
ДФ 26.240.001 у Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
старшому науковому співробітнику
відділу хімії та біохімії ферментів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України доктору біологічних
наук Гриненко Тетяні Вікторівні

ВІДГУК

Офіційного опонента - доктора біологічних наук, професора, начальниці
науково-дослідної частини Київського національного університету імені Тараса
Шевченка Толстанової Ганни Миколаївни

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

Хіти Олени Олександрівни

«МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ
ПРОТЕЇНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЗА УМОВ ПРИГНІЧЕННЯ IRE1»

представлену до захисту у спеціалізовану вчену раду ДФ 26.240.001
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, на здобуття ступеня
доктора філософії у галузі 09-Біологія за спеціальністю 091-Біологія

Актуальність теми дисертації. Робота Олени Олександрівни є актуальним дослідженням, оскільки вона була направлена на з'ясування деяких молекулярних механізмів репрограмування функціонального стану мітохондрій, що лежать в основі анти-проліферативного ефекту пригнічення сенсорно-сигнального протеїну IRE1, основного медіатора відповіді на неправильно згорнуті протеїни, у клітинах гліоми лінії U87. За даними ВООЗ, щороку у світі реєструють більше 3,7 мільйонів нових випадків онкологічних захворювань і майже 2 мільйони смертей, викликаних онкопатологіями, причому найбільш злоякісними і поширеними пухлинами головного мозку є гліоми, що важко піддаються терапії і характеризуються короткою тривалістю виживання пацієнтів. Наразі не існує ефективних методів лікування гліом, саме тому вивчення молекулярних механізмів патогенезу цих пухлин є надзвичайно важливим напрямком сьогодення. Тема дисертаційної роботи присвячена вивченню механізмів опосередкованої сигнальним протеїном IRE1 та гіпоксією

регуляції експресії ядерних генів, що кодують ключові протеїни мітохондрій та забезпечують протікання основних функцій цих органел.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалася протягом 2016-2019 рр. у рамках проведення планових досліджень за наступними 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. Олена Олександрівна *вперше* продемонструвала, що експресія ядерних генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SHDB*, *SDHD*, *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT*, *FAM162A*, *LONP1*, *AIFM1*, *TRADD* та *ATG7*, які кодують функціонально різні протеїни мітохондрій, є залежною від стресу ендоплазматичного ретикулума, а саме від функціонування сенсорно-сигнального протеїну IRE1, причому у гено-специфічний спосіб. Нею також встановлено, що стрес-залежна регуляція цих генів може здійснюватися як через протеїнкіназу, так і ендорибонуклеазну активності сигнального протеїну IRE1, а у деяких випадках ще й за участі інших шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума. Виявлено, що експресія більшості досліджених генів є залежною від гіпоксії, причому пригнічення функціональної активності IRE1 переважно модифікує ефект гіпоксії на експресію цих генів. Це є надзвичайно важливим для розуміння молекулярних основ резистентності злоякісних пухлин до токсичної дії гіпоксії. Продемонстровано наявність різної чутливості експресії досліджених генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми до умов дефіциту як глюкози, так і глутаміну, а також її залежність від функціональної активності IRE1-залежного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума.

Важливим моментом роботи є біоінформаційний аналіз промоторних послідовностей досліджених генів на наявність регуляторних елементів, що розпізнаються транскрипційними факторами XBP1 та HIF. Такі сайти зв'язування були виявлені в промоторних ділянках більшості проаналізованих генів, причому в деяких випадках ці послідовності водночас містили у своїй структурі і сайти зв'язування XBP1, зокрема в промоторних ділянках генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *SDHD*, *POLG*, *MTIF2*, *ENDOG*, *NR3C1* та *LONP1*, (CGTGG/CCACG). Цей феномен ілюструє механізм кооперативної регуляції експресії частини ядерних генів, що кодують полі-функціональні протеїни мітохондрій, шляхом розпізнавання різними транскрипційними факторами одних і тих же специфічних сайтів зв'язування та пояснює залежність гіпоксичної регуляції від функціонування сигнального протеїну IRE1.

Важливими є також результати дослідження мікроРНК, сайти зв'язування яких було виявлено в 3'-нетранслюємих послідовностях деяких досліджених нами мРНК за допомогою методів біоінформатики. Встановлено, що у клітинах гліоми із пригніченням IRE1 зниження рівня експресії мРНК *ME2*, *POLG*, *TSMF*, *TRADD* та *ATG7* супроводжується підвищенням рівня відповідних кожній із них мікроРНК (miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 та -588), а це свідчить про причетність даних мікроРНК до регуляції експресії відповідних генів на пост-транскрипційному рівні.

Отримані в дисертаційній роботі Хіти О.О. результати вказують на важливу роль виявлених змін експресії ядерних генів, що кодують ключові мітохондріальні ензими та фактори, у пригніченні проліферації клітин гліоми, опосередкованому інгібуванням функціональної активності IRE1.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає у з'ясуванні молекулярних механізмів, що лежать в основі зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми, опосередкованого пригніченням сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на неправильно згорнуті протеїни і що необхідно для створення нових протипухлинних препаратів системної терапії гліом, зокрема на основі ідентифікованих нами потенційних генів-мішеней *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1* та *NNT*, з урахуванням чутливості їх експресії до

важливих факторів пухлинного мікрооточення: гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну. 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 у 29 наукових публікаціях:

• 13 статей у іноземних та вітчизняних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України. Десять із опублікованих статей представлені в базах даних Scopus, PubMed і Web of Science.

16 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конференцій і конгресів, включаючи IUBMB, FEBS та Parnas Conference.

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 Олени Олександрівни представлена за загальноприйнятою формою, що відповідає вимогам МОН України. Робота викладена на 175 сторінках та складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів власних досліджень, їх обговорення, висновків та списку цитованої літератури, що включає 255 посилань. Робота містить 57 рисунків та 8 таблиць. Структура дисертації логічно побудована, що сприяє розкриттю змісту теми дослідження і виконанню поставлених завдань.

В зробленому Оленою Олександрівною огляді літератури висвітлено сучасний стан проблеми, зокрема, детально охарактеризовані ядерні гени, що кодують ключові ензими трикарбонного циклу та фактори, залучені у контроль мітохондріального геному, апоптоз та автофагію, роль функціонального репрограмування мітохондрій у злоякісному рості та особливості IRE1-

опосередкованого сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. При цьому авторкою було проаналізовано досить велику кількість нових, переважно закордонних публікацій, що мають безпосереднє відношення до теми дисертації.

Робота виконана на сучасному методичному рівні з використанням методів біохімії та молекулярної біології, які були детальні описані у розділі 2 даної роботи. В дисертації Хіти О.О. представлені результати численних досліджень, характерною особливістю яких є новизна, а також їх теоретичне та практичне значення.

У розділі «Обговорення результатів» зроблений детальний аналіз отриманих результатів і проведено їх обговорення.

Висновки сформульовані чітко, вони цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Наукові положення та висновки, наведені в дисертації Олени Олександрівни, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу фактажу, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Дисертація виконана з дотриманням усіх вимог біоетики (протокол №3 засідання комісії з біоетики і біобезпеки Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України від 14 січня 2020 р.).

Дисертаційна робота Олени Олександрівни заслуговує на позитивну оцінку, але в процесі роботи над дисертацією виникло кілька **дискусійних питань:**

1. В роботі показано, що експресія більшості досліджених генів змінюється за умов пригнічення активності сигнального протеїну IRE1, але різними механізмами. Розкажіть більш детально про ці механізми?

2. Ви показали, що дефіцит глутаміну істотно впливає на рівень експресії багатьох досліджених Вами генів і що цей вплив залежить від активності сигнального протеїну IRE1. То яку ж роль відіграє глутамін у рості гліом, яка

роль мітохондрій у забезпеченні клітин глутаміном і як це залежить від стресу ендоплазматичного ретикулула?

3. Як Ви думаєте, активність мітохондрій у пухлинах, зокрема гліомах, знижується чи посилюється? І в якому напрямку змінюється активність мітохондрій за умов пригнічення IRE1?

Вищенаведені питання і побажання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи, адже вони стосуються переважно інтерпретації її результатів.

Висновок. Дисертаційна робота Хіти Олени Олександрівни «Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1» є завершеною науковою працею, що розкриває молекулярні механізми стрес-залежної регуляції експресії ядерних генів протеїнів мітохондрій за онкогенезу. Актуальність теми, новизна дослідження, теоретичне і практичне значення результатів, представлених у роботі, а також високий методичний рівень проведених досліджень, свідчать про високий науковий рівень здобувачки, а дисертаційна робота Хіти Олени Олександрівни «Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1» повністю відповідає вимогам пп. 10, 11 «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», що затверджений Постановою Кабінету Міністрів України від 06 березня 2019 року, №167, а тому вважаю, що здобувачка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент:

Доктор біологічних наук, професор,
начальниця науково-дослідної частини
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка



ПІСЬМО ЗАСІДУ
ВЧЕШНЬОГО СЕКРЕТАРІАТУ
НАУКОВО-ДОСЛІДНОЇ ЧАСТИНИ
НАУКОВО-ДОСЛІДНОЇ ЧАСТИНИ
04.12.2020р.