

10/04/23 № - 120 -

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт
биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича»
доктор биологических наук
Е.А. Пономаренко


« 10 » 04 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) о научно-практической значимости диссертационной работы Кучура Олега Александровича «Механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток при комбинировании ионизирующего излучения и ингибиторов CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4.- Биохимия

Актуальность темы диссертации

Регуляция экспрессии генов в эукариотических клетках, подвергнутых экзогенным стрессовым воздействиям, в частности, терапевтическим – один из важнейших аспектов современной биологии. Углубление фундаментальных знаний о молекулярных механизмах регуляции экспрессии генов необходимы для

создания современных лекарств. Особенно актуальна эта проблема для экспериментальной и клинической онкологии.

Белок p53 – многофункциональный транскрипционный фактор, выполняющий роль координатора ответов клетки на разнообразные стрессовые факторы. Активность p53 регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, причем первый менее изучен. Вместе с этим, именно механизм адаптации клеток к стрессу – перепрограммирование транскрипции с участием циклинзависимых протеинкиназ 8 и 19 (CDK8, CDK19) позволяет клетке выжить после воздействия. В опухолевых клетках такое “ускользание” может приводить к формированию вторичного новообразования с новыми неблагоприятными признаками. Автор использовал модель облучения опухолевых клеток с различным статусом p53 (интактный или нефункционирующий) для индукции повреждений, исход которых может быть обусловлен ролью CDK8/19. В настоящее время появились возможности таргетного воздействия на механизм перепрограммирования транскрипции, однако биохимические процессы, сопровождающие этот феномен, а также последствия комбинированного применения терапевтического воздействия и ингибитора CDK8/19 остаются неизученными. В связи с этим работа О.А. Кучура посвященная исследованию одного из таких механизмов, высоко актуальна.

Связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Исследование соответствует задачам мероприятия 1.2. «Проведение проблемно-ориентированных поисковых исследований и создание научно-технического задела по технологиям в области живых систем» федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы" (Постановление Правительства РФ от 17 октября 2006 г. № 613).

Новизна полученных результатов и выводов

В диссертации впервые выявлен феномен регуляции выживания опухолевых клеток человека, подвергнутых воздействию терапевтических доз ионизирующего излучения, в зависимости от статуса p53 (интактный или нефункционирующий) и

активности циклинзависимых протеинкиназ 8/19 (CDK8/19). Впервые установлен механизм повышения гибели облученных клеток с интактным p53 при ингибировании CDK8/19: предотвращение индукции гена *TP53*. Ингибирование CDK8/19 в облученных клетках с интактным p53 функционально сходно с нокаутом гена *TP53*. Кроме этого, впервые выявлены механизмы регуляции p53-зависимых событий при ингибировании CDK8/19 и определены белки-партнеры p53, чувствительные и нечувствительные к ингибиторам CDK8/19. Новым является установление возможности повышения эффективности лучевого воздействия его комбинированием с нетоксичными ингибиторами CDK8/19.

По результатам работы автор предложил новый механизм усиления гибели опухолевых клеток человека в зависимости от статуса p53 и функционирования аппарата перепрограммирования транскрипции.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа построена по стандартному принципу: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и обсуждения, завершается выводами и указателем литературы.

«**Обзор литературы**» содержит детальные сведения об обобщенных аспектах, включая значимость проблемы, статистику заболеваемости и смертности в России и мире. Далее следуют разделы о роли отдельных молекулярных механизмов в патогенезе опухолей. Подробно представлена роль p53 в биологии опухолей: регуляция выживаемости клеток, смены фаз клеточного цикла.

Новым является углубленный анализ перепрограммирования транскрипции в целом как биологического механизма и как фактора становления неблагоприятных фенотипов в клетках, переживших терапевтические воздействия. Этот раздел особенно оригинален, т.к. представляет собой новый подход к проблеме, являющийся основным содержанием диссертации.

Обзор литературы написан понятным языком, сложные вопросы изложены на профессиональном уровне.

Раздел «**Материалов и методов**» содержит подробное описание всех использованных экспериментальных методов, реагентов и оборудования. Опыты выполнены на высоком современном методическом уровне с применением

фармакологических, биохимических, клеточных и молекулярных подходов. Используются линии клетки с генетически обусловленным нокаутом отдельных механизмов.

В главах «**Результаты работы**» и «**Обсуждение**» представлены полученные автором данные о различной роли интактного и нефункционирующего p53 в ответах опухолевых клеток на действие терапевтических доз ионизирующего излучения. Особую важность представляют новые результаты с фармакологическим ингибитором CDK8/19 - сенексином Б: комбинирование облучения с этим соединением в функциональном отношении эквивалентно отсутствию p53. Этот нетривиальный результат положил основу дальнейшему исследованию: автор логично планирует эксперименты по выявлению молекулярных механизмов указанного эффекта. Важность снижения сенексином Б активации p53 в облученных клетках патентована диссертантом и имеет практическое значение для радиоонкологии.

Установив различия эффектов сенексина Б на выживаемость клеток с разным статусом p53, О.А. Кучур последовательно выявил уровни, на которых действует ингибитор CDK8/19 и механизмы регуляции p53, не зависящие от сенексина Б. Это дифференцированное действие подтверждает специфический характер перепрограммирования транскрипции: этот механизм действует в особенных условиях, и выявление таких условий принципиально важно. Интересны и новы результаты с ингибиторами CDK8/19 несенексиновой природы, а также опыты с нокаутом CDK8, подтверждающие роль этой киназы в регуляции p53 при ионизирующем излучении.

В целом представление результатов и обсуждение новых направлений на основе собственных данных производит впечатление большой, инновационной и самостоятельной работы.

Выводы, вытекающие из представленных данных, полностью отражают существо проведенных исследований.

Список литературы включает все использованные источники (243 ссылки). Текст диссертации содержит 1 таблицу и 49 рисунков.

Значимость для науки и практики

Работа носит междисциплинарный характер. С позиций фундаментальной биологии работа важна как новый подход к регуляции выживаемости клеток эукариот (в частности, опухолевых клеток человека) при действии стрессовых раздражителей. С практических позиций установленная автором возможность усиливать эффективность ионизирующего излучения путем ингибирования перепрограммирования транскрипции нетоксичным низкомолекулярным химическим соединением открывает подход к использованию указанных агентов в практике. Последний аспект подтвержден патентом РФ.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Результаты исследований роли p53 и перепрограммирования транскрипции при действии ионизирующего излучения важны для углубления знаний о биохимических механизмах гибели клеток эукариот в ответ на стрессовые воздействия. Особую ценность представляют результаты экспериментов, выполненных на генетических системах – линиях клеток с нокаутированными p53 или CDK8, а также опыты с новыми патентоспособными ингибиторами отдельных механизмов. Результаты работы могут быть использованы в лекциях по биохимии, молекулярной биологии, онкологии и радиобиологии профильных университетов и медицинских вузов, а также в исследованиях Института молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта РАН, Института биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, федерального биофизического центра им. А.И.Бурназяна ФМБА России.

Замечания по диссертационной работе

Считаю целесообразным получить ответы диссертанта на следующие вопросы.

1. Как соотносятся роли CDK8 и CDK19? Эти киназы выполняют одинаковые функции, и отличия состоят только в преимущественной экспрессии той или иной киназы в конкретных линиях/тканях? Или у CDK8 и CDK19 есть принципиальные функциональные отличия?

2. Как можно объяснить киназозависимую и -независимую роли CDK8/CDK19? Почему в отдельных ситуациях эффекты фармакологического (Сенексин Б) и генетического (CRISPR/Cas9 опосредованный нокаут) ингибирования неодинаковы?
3. Какие эксперименты может предложить автор для подтверждения гипотезы о промоторной регуляции экспрессии гена *Trp53* при комбинациях сенексина Б, ингибитора NFκB и облучения?

В тексте имеются опечатки. Следует уточнить физическую природу частиц, использованных для облучения клеток на конкретной установке в ВМА.

Указанные замечания не снижают высокой ценности диссертационной работы.

Печатные работы

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, внесенных в перечень изданий, утвержденных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, и 7 работ в сборниках материалов научных конференций.

Заключение

Диссертационная работа Кучура О.А. «Механизмы усиления гибели p53-положительных опухолевых клеток при комбинировании ионизирующего излучения и ингибиторов CDK8/19-зависимого перепрограммирования транскрипции» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной задачи по установлению механизмов повышения эффективности гибели опухолевых клеток человека в зависимости от статуса p53 и функционирования механизма перепрограммирования транскрипции, имеющей значение для развития биохимии. По актуальности темы, объему проведенных исследований и полученным результатам полностью соответствует требованиям, соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства

Российской Федерации от 01 октября 2018 г. № 1168 с изменениями от 20 марта 2021 года № 426 и от 26 сентября 2022 г. № 1690), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на совместной конференции профильных лабораторий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), протокол № 2 от 29 марта 2023 г.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории биосинтеза белков ИБМХ
кандидат биологических наук

Морозевич Галина Евгеньевна

Заведующий лабораторией
медицинской биотехнологии ИБМХ
доктор биологических наук

Жданов Дмитрий Дмитриевич

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8.
Тел.: +7 (499) 246-69-80.
Электронная почта: inst@ibmc.msk.ru
Официальный сайт: www.ibmc.msk.ru

Подписи Г.Е. Морозевич и Д.Д. Жданова заверяю:

Ученый секретарь ИБМХ
кандидат химических наук



Карпова Елена Анатольевна