

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Грязнової Тетяни Анатоліївни «Комплекси білків родини інтерсектинів з верпролінами WIP і CR16 – компоненти апарату транспорту везикул та актинового цитоскелета», представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми дисертації. Дослідження взаємодій компонентів сигнальних шляхів на рівні протеїнів є важливими для розуміння складної системи регуляції у клітинах як у нормі, так і за різних патологічних станів. Дисертаційну роботу Тетяни Анатоліївни Грязнової присвячено дослідженню молекулярних механізмів реорганізації актинового цитоскелету, які є важливими для міграції та інвазії клітин, а тому ця робота є актуальною. Ключову роль в інтеграції сигнальних каскадів та тонкій регуляції їх взаємодій відіграють адапторні протеїни, до яких відносяться й інтерсектини, що асоційовані з нейродегенеративними захворюваннями та злоякісною трансформацією клітин і які можуть взаємодіяти з регуляторами полімеризації актину – WIP та CR16. Така взаємодія була передбачена біоінформатичним аналізом і виявлення таких взаємодій *in vitro* та *in vivo* є безумовно актуальним, оскільки надає можливість ідентифікувати нові функціональні зв'язки в перебудовах актинового цитоскелету.

Загальна характеристика роботи. Дисертація складається із таких розділів: вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який охоплює 188 найменувань. Дисертацію викладено на 139 сторінках стандартного машинопису і містить вона 44 рисунки.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 10 публікацій, у тому числі 5 статей, які надруковані в журналах, що входять до наукометричної бази Scopus. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

У розділі 1 «Огляд літератури» наводиться загальна характеристика білків родини інтерсектинів і верпролінів, а також патології, що асоційовані з ними. Розглядається один із головних механізмів клітинної інвазії та міграції – реорганізація актинового цитоскелету за допомогою білків родини WASP та Arp2/3 комплексу, описуються ключові структури клітинної інвазії – подосоми та інвадоподії. Особлива увага приділяється ролі верпролінів в інвазії та деградації позаклітинного матриксу.

У розділі 2 «Матеріали і методи» описані методи, застосовані для проведення експериментів. Слід зазначити, що в роботі використані **сучасні методи молекулярної**

біології і біохімії (створення плазмідних конструкцій, електрофорез у поліакриламідному гелі, вестерн-блот аналіз, коїмунопреципітація та трансфекція клітин), а також конфокальна мікроскопія, імунофлуоресцентний аналіз, аналіз інтерналізації трансферину і метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу. Отримані результати статистично оброблені з використанням сучасних методів.

У розділі 3 «Результати експериментальних досліджень» Тетяна Анатоліївна досить коректно представила **результати своїх експериментальних досліджень**, які чітко продемонстрували існування білкових комплексів між інтерсектинами та регулятором полімеризації актину WIP, причому показала, що формування комплексів забезпечується доменами SH3A, SH3C і SH3E інтерсектинів та амінокислотними залишками 318-450 пролін-збагаченого домену WIP. Тетяна Анатоліївна також виявила вплив комплексу ITSN1/WIP на везикулярний транспорт рецептора трансферину та його можливу участь у RAB4-залежному везикулярному транспорті везикул. Було також показано, що комплекс ITSN1/WIP індукує утворення філоподієподібних виступів і що це може свідчити про його участь у міграції клітин.

Крім того, Тетяна Анатоліївна показала існування потрійного комплексу між ITSN1, WIP та N-WASP. У складі цього потрійного комплексу WIP сприяє взаємодії N-WASP з ITSN1, тоді як наявність N-WASP зменшує зв'язування WIP з ITSN1. За даними літератури взаємодія N-WASP з ITSN1 викликає полімеризацію актину *in vitro*, тому Тетяною Анатоліївною було висловлено припущення, що WIP сприяє цьому процесу.

WIP є одним із ключових компонентів інвадоподій. В дисертаційній роботі продемонстровано, що інтерсектини локалізуються в інвадоподіях інвазивних клітин раку грудної залози лінії MDA-MB-231. Оскільки інтерсектини взаємодіють з WIP та локалізуються в інвадоподіях, було висловлено припущення, що взаємодія досліджуваних протеїнів може бути важливою для формування або функціонування цих інвазивних структур.

В роботі також показано, що інтерсектини взаємодіють з CR16, іншим членом родини верпролінів. Цікаво, що CR16 формує комплекс з ізоформою SH3A-домена ITSN1, яка є специфічною для нейронів і експресія *CR16* була виявлена в гліобластомах.

У розділі 4 «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» Тетяна Анатоліївна аналізує власні дані та порівнює їх із опублікованими результатами інших дослідників. З урахуванням даних літератури та на основі отриманих результатів вона пропонує гіпотетичну модель полімеризації актину за участі ITSN, WIP, згідно з якою взаємодія ITSN з WIP дозволяє Cdc42 активувати N-WASP з подальшою активацією Arp2/3 комплексу.

Стосовно **наукової новизни одержаних результатів**, то Тетяною Анатоліївною вперше були виявлені нові взаємодії інтерсектинів з WIP, N-WASP та CR16, регуляторами полімеризації актину, що проясняє молекулярні механізми перебудов актинового цитоскелету, опосередкованих N-WASP, порушення яких тісно пов'язане із злоякісною трансформацією клітин, а також вплив комплексу ITSN1/WIP на везикулярний транспорт рецептора трансферину та його можливу участь у RAB4-залежному везикулярному транспорті везикул. Вперше показано, що комплекс ITSN1/WIP індукуює утворення філоподієподібних виступів і що це може свідчити про його участь у міграції клітин.

Практичне значення роботи полягає в тому, що інтерсектини і WIP можуть виступати в якості потенційних мішеней для терапевтичних засобів лікування онкологічних станів, оскільки WIP є потенційним діагностичним біомаркером інвазивності ракових клітин грудної залози. Отримані результати розкривають роль інтерсектинів та WIP, як нових молекулярних компонентів інвадоподій, що дозволить краще зрозуміти формування та функціонування цих інвазивних структур.

Апробацію одержаних результатів проведено на достатньому рівні. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей в іноземних та українських фахових наукових виданнях, що представлені в наукометричній базі Scopus, і 5 тез доповідей у матеріалах міжнародних та українських наукових форумів, конгресів і конференцій. Основні результати дисертаційної роботи знайшли відображення в опублікованих працях.

Поряд з наведеними позитивними сторонами дисертаційної роботи, на мій погляд, доцільно почути думку Тетяни Анатоліївни стосовно деяких **дискусійних питань**:

1. Який механізм полімеризації актину і які фактори задіяні в цьому процесі? Чи є особливості полімеризації актину в різних типах клітин?
2. Чим відрізняється полімеризація актину в нормальних і пухлинних клітинах?
3. Які особливості полімеризації актину в різних типах пухлинних клітин?
4. Які ще фактори впливають на формування філоподієподібних виростів, окрім комплексу ITSN1/WIP, і чи є особливості утворення таких виростів у клітин різних видів пухлин?
5. В якій мірі формування філоподієподібних виростів клітинами залежить від їх інвазивності?


Не зовсім зрозумілим є підпис до Рис. 3.12, "Кількісна оцінка результатів, відображених на рис. 3.12", а також вислів "ITSN1 зв'язує CR16, який знаходиться в комплексі з ендогенним β -актином, та забезпечує його **локалізацію** до сайтів

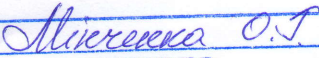
полімеризованого актину”. Що саме розуміється під “його локалізацією до сайтів актину”?

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

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред’являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Грязнової Тетяни Анатоліївни «Комплекси білків родини інтерсектинів з верпролінами WIP і CR16 – компоненти апарату транспорту везикул та актинового цитоскелета» є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., (зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), які пред’являються до кандидатських дисертацій, а Тетяна Анатоліївна Грязнова заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,
член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор,
завідувач відділу молекулярної біології
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
Національної академії наук України

 Мінченко О.Г.

Підпис 
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
" 05 " 05 2019 р.

