

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

З'ясування молекулярних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації, що залежить від утворення мультимолекулярних комплексів за допомогою адаптерних білків, є надзвичайно важливим напрямком сучасної молекулярної біології, який має велике значення для розуміння закономірностей регуляції перебігу клітинних процесів. Дисертаційна робота Т. А. Грязнової присвячена дослідженню взаємодії адаптерних білків – інтерсектинів 1 і 2 (ITSN1, 2) – з регуляторами процесів полімеризації актину – верпролінами WIP і CR16. Оскільки молекулярні механізми перебудов актинового цитоскелета, порушення яких пов'язані зі злоякісною трансформацією, є недостатньо вивченими, тему дисертаційної роботи слід визнати **актуальною** – як у фундаментальному, так і у прикладному аспектах.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 139 сторінок основного тексту. Дисертація ілюстрована 44 рисунками, список використаних джерел містить 188 посилань. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 10 публікацій, в тому числі 5 статей у фахових наукових виданнях: усі статті надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus, серед них 4 – у журналах з імпаکت-фактором на рівні між 2,5 і 4 (квартилі 1 та 2). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо загальної характеристики інтерсектинів та їхньої функціональної ролі, а також перебудов актинового цитоскелета за допомогою верпролінів, є стислим, але надзвичайно змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної біології, описаних у Розділі 2: синтез і клонування кДНК, електрофорез нуклеїнових кислот і білків, експресія рекомбінантних білків, трансфекція еукаріотичних клітин, афінна хроматографія, вестерн-блотинг, імунопреципітація, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія тощо.

Робота Т. А. Грязнової мала на меті охарактеризувати взаємодії інтерсектинів з двома білками, невідомими раніше у якості партнерів такої взаємодії, – WIP і CR16. Отримані результати представлено у двох підрозділах розділу 3.

Перший підрозділ зосереджено на взаємодіях інтерсектинів з білком WIP, а також його партнером – білком N-WASP. Автором продемонстровано взаємодію ITSN1 з WIP, показано колокалізацію цих двох білків у клітинах, визначено домени двох білків, від яких залежить взаємодія між ними. Представлено докази формування потрійного комплексу ITSN1–WIP–N-WASP та досліджено цікаві взаємовідносини між трьома білками при формуванні такого комплексу. Не обмежившись новою інформацією про взаємодії ITSN1 з WIP, автор отримала дані про функціональну роль такого комплексу: залучення його до регуляції везикулярного транспорту, взаємодію з регуляторною GTPазою RAB4, можливу участь у перебудовах актинового цитоскелета. Крім того, отримано дані, що свідчать про взаємодію WIP і з іншим інтерсектином – ITSN2, та показано присутність обох інтерсектинів, а також комплексу ITSN1–WIP, в інвадоподіях.

У другому підрозділі розділу 3 представлено докази взаємодії обох інтерсектинів з іншим верпроліном – білком CR16. Отримано цікавий

результат про те, що ITSN1 не заважає білку CR16 взаємодіяти з актином, а ITSN2 – навпаки, перешкоджає таким взаємодіям. Показано, що білки ITSN1 і CR16 колокалізуються в клітині один з одним, а також з клатрином і актином.

У розділі 4, який присвячено обговоренню отриманих результатів, автор, аналізуючи їх у широкому загальному контексті даних інших дослідників, обґрунтовує модель участі інтерсектинів і білка WIP у регуляції полімеризації актину.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи Т. А. Грязнової полягає в тому, що в ній вперше ідентифіковані нові білки-партнери інтерсектинів – регулятори полімеризації актину WIP і CR16, охарактеризовано взаємодії інтерсектинів з цими білками і визначено функціональну роль таких взаємодій. Представлені у роботі дані збагачують знання щодо молекулярних механізмів регуляції полімеризації актину. Оскільки порушення такої регуляції асоційовано зі злоякісною трансформацією, отримані дані можуть бути використані у дослідженнях механізмів канцерогенезу. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузях молекулярної біології і медицини, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням принципів внутрішньоклітинної сигналізації і механізмів канцерогенезу та пошуком нових підходів у діагностиці ракових захворювань.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування експериментальних підходів, що доповнюють один одного, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють констатувати **достовірність експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків**.

Загалом, дисертація демонструє надзвичайно високий рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. До дисертаційної роботи Т. А. Грязнової

принципових зауважень немає. При ознайомленні з дисертацією виникло тільки декілька **запитань**.

1. У роботі показано, що ITSN1 може взаємодіяти з білком WIP як безпосередньо, так і в складі потрійного комплексу ITSN1–WIP–N–WASP. Від чого, на думку автора, залежить, який тип комплексу (подвійний чи потрійний) буде переважати в клітині, і яка функціональна різниця між комплексами двох типів?

2. У розділі 4 висловлюється припущення про те, що "взаємодія ITSN1-S з WIP залучає комплекс WIP/N-WASP до місць, де відбувається реорганізація кортикального актину". Наскільки таке припущення узгоджується з представленими у роботі результатами про те, що у складі потрійного комплексу ITSN1–WIP–N–WASP білок WIP не взаємодіє безпосередньо з ITSN1? Тобто, скоріше, взаємодія ITSN1 з N-WASP рекрутує комплекс WIP/N-WASP до тих чи інших місць.

3. За наведеними у роботі даними, ITSN1 не здатен безпосередньо взаємодіяти з актином. Як тоді пояснити суттєвий вплив надекспресії цього білка (у відсутності надекспресії WIP) на утворення структур, подібних до філоподій?

Наведені запитання жодним чином не впливають на загальну **високу** оцінку розглянутої роботи.

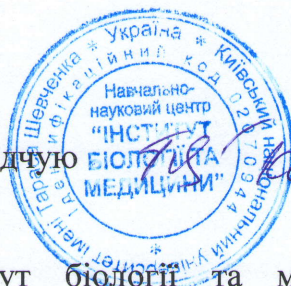
Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Грязнової Тетяни Анатоліївни "Комплекси білків родини інтерсектинів з верпролінами WIP і CR16 – компоненти апарату транспорту везикул та актинового цитоскелета" є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які

пред'являються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
професор кафедри загальної та медичної генетики
ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського
національного університету імені Тараса Шевченка

А. В. Сиволюб

Підпис проф. А. В. Сиволюба засвідчую



Заст. директора ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка