

ВІДЗИВ

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Паньківського Сергія Володимировича
«ПОШУК ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДЕРНИХ ФУНКЦІЙ ПРОТЕЇНА
ЕНДОЦИТОЗУ ITSН1»,

представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Скафолдні білки відіграють важливу роль у компартменталізації клітини, забезпечуючи часову і просторову збірку білкових комплексів, регулюючи активацію чи пригнічення різноманітних клітинних процесів. Як наслідок, порушення експресії генів, що кодують скафолдні білки, призводить до розвитку патологічних станів. Крім того, дослідження функцій білків-скафолдів є цікавим в контексті багатофункціональності білків. Цей феномен, який пов'язаний із виявленням неканонічних функцій білків і якому зараз присвячено багато уваги, розкриває нові механізми регуляції клітинних процесів. Прикладом багатофункціональних скафолдів є білок ITSН1, який за рахунок мультидоменної структури бере участь в регуляції низки цитоплазматичних процесів і асоційований із розвитком ракових та нейродегенеративних захворювань, а також патологічними станами легенів. Нещодавно було виявлено і ядерну локалізацію цього білка, хоча функціональне значення цієї властивості не було досліджено. Аналіз ядерного інтерактому білка ITSН1 є безумовно актуальним, оскільки дає можливість ідентифікувати нові функціональні зв'язки між ядерними і цитоплазматичними процесами клітини. Важливими елементами, які пов'язують ці клітинні процеси є РНК-зв'язуючі білки, які забезпечують дозрівання, транспорт, трансляцію і деградацію мРНК, утворюючи рибонуклеопротеїнові комплекси, порушення яких часто призводить до патологічних станів, включаючи канцерогенез і нейродегенеративні захворювання. Тому пошук функціонального зв'язку між скафолдним білком ITSН1 і ядерними РНК-зв'язуючими білками є безсумнівно важливим для виявлення нових механізмів, що лежать в основі розвитку зазначених порушень.

Мета дисертаційної роботи полягала у пошуку потенційних ядерних партнерів ITSNI та аналізі його ролі у ядрі клітини. Відповідно до мети поставлено низку завдань, що включали аналіз внутрішньоклітинної локалізації ITSNI в клітинах HeLa, виявлення та характеристику нових білків партнерів ITSNI з-поміж РНК-зв'язуючих білків, та аналіз впливу ITSNI на функціонування визначених білків-партнерів у клітині. Дане дослідження вимагало залучення широкого набору сучасних молекулярно-біологічних, біохімічних та клітинних методів дослідження.

Дисертаційна робота побудована за традиційною схемою і включає анотацію, вступ, огляд літератури, методичну частину, результати і їх обговорення, висновок та список використаних джерел. Огляд літератури справляє враження належного ознайомлення автора із сучасними станом проблем, пов'язаних із об'єктом та предметом даного дослідження. Особливої уваги приділено функціональній характеристиці ITSNI та його потенційного партнера РНК-зв'язуючого білка SAM68 в контексті нормального функціонування клітин та розвитку патологій. Особливої уваги заслуговує методична частина роботи. Автором було використано великий набір методів і підходів, включаючи створення рекомбінантних плазмідних конструкцій, афінну очистку рекомбінантних білків, методи дослідження білок-білкових взаємодій, флуоресцентну мікроскопію, дослідження взаємодії між білками та нуклеїновими кислотами, атомно-силову мікроскопію, ЯМР-аналіз, пригнічення експресії генів за допомогою антисенсових РНК, аналіз альтернативного сплайсингу в клітинах, та інші. Застосування такого набору методів дозволило виявити низку вагомих та цікавих результатів, що мають важливе наукове та практичне значення.

Зокрема в роботі виявлено декілька потенційних партнерів ITSNI серед РНК-зв'язуючих білків, що було показано за допомогою *in vitro* аналізу. Значну частину роботи присвячено детальній характеристиці взаємодії ITSNI і РНК-зв'язуючого білка SAM68. Можливість формування комплексу між цими

партнерами показано як *in vitro*, так і в клітині за допомогою цікавих та наочних підходів з використанням флуоресцентної мікроскопії. Отримані результати не залишають ніяких сумнівів щодо існування взаємодії між ITSN1 та SAM68. Подальші результати описують можливий вплив ITSN1 на властивості SAM68 *in vitro* та в клітині. Зокрема автором проаналізовано вплив ITSN1 агрегацію SAM68 та його здатність взаємодіяти із РНК. В ході аналізу було виявлено, що домени SH3 ITSN1 запобігали агрегації SAM68, але не впливали на зв'язування SAM68 із РНК. Автором вперше показано можливість взаємодії між доменом SH3 ITSN1 та нуклеїновими кислотами, зокрема РНК, *in vitro*, що значно розширює уявлення щодо багатофункціональності білкових доменів та їх ролі в клітинних процесах. Виявлена *in vitro* взаємодія відкриває перспективи для подальшого продовження роботи з визначення функціонального значення взаємодії між ITSN1 та РНК.

В роботі виявлено, що ITSN1 може запобігати агрегації SAM68 у клітинах HeLa та сприяти дисоціації SAM68-специфічних гранул – структур, які є характерними для різноманітних рибонуклеопротеїнових комплексів і які часто асоційовані із патологічними змінами в клітині. Вплив ITSN1 на SAM68 у клітині підтверджено за допомогою аналізу альтернативного сплайсингу кількох пре-мРНК, асоційованих із SAM68. Пригнічення експресії гена ITSN1 призвело до значних змін в одній із п'яти проаналізованих подій сплайсингу та сприяло зростанню експресії прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1. Роль ITSN1 в регуляції альтернативного сплайсингу є цікавим питанням і стане темою подальших досліджень.

Отримані результати підсумовані гіпотетичною схемою, що значно полегшує сприйняття та наочно узагальнює отримані дані і їх контекст. Хоча в роботі використовували клітини лінії HeLa, отримані дані можуть бути екстрапольованими на інші моделі, зокрема нейрони, де формування агрегатів SAM68 за рахунок зв'язування із CGG повторами мРНК гена *FMR1* призводить

до порушення SAM68-опосередкованого сплайсингу, що спостерігається при синдромі тремору та атаксії, асоційованих із ламкою X хромосоною.

Висновки повною мірою відповідають отриманим результатам. Наукові здобутки дисертаційної роботи опубліковано в 12 наукових роботах, серед яких 3 статті у фахових виданнях та 9 тез у збірниках вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

Поряд із вказаними позитивними сторонами дисертаційної роботи, варто звернути увагу на декілька зауважень та дискусійних питань:

1. В роботі зустрічаються невдалі вирази та висловлювання, повторення та англіцизми.
2. Декілька важливих висновків роботи ґрунтуються на результатах, отриманих за допомогою методу аналізу білок-білкових взаємодій в клітині на мікротрубочках. На жаль, в роботі не наведено переваг використання цього методу. Чи має цей підхід суттєві переваги перед класичними методами аналізу білок-білкових взаємодій?
3. Хоча автором проведено низку експериментів для підтвердження взаємодії між доменом SH3 та мРНК, незрозумілим залишається механізм взаємодії між ITSN1 та нуклеїновою кислотою. На скільки ця взаємодія є специфічною і чи залежить вона від послідовності РНК?
4. Не зважаючи на застосування кількох методів для аналізу взаємодії ITSN1-мРНК *in vitro*, можливість такої взаємодії в клітині не перевіряли. Яке ж потенційне функціональне значення взаємодії між ITSN1 та мРНК в клітині?
5. Ефект пригнічення експресії гена *ITSN1* на SAM68-залежний сплайсинг, який аналізували в даній роботі, не є прямим, а може опосередковуватись змінами у сигнальних каскадах клітини, в яких бере участь ITSN1. Чи розглядав автор такий варіант ролі ITSN1 в регуляції сплайсингу?

Зазначені питання і зауваження ні в якому разі не знижують цінності дисертаційної роботи, яка безумовно є актуальною і сприяє розумінню перебігу і регуляції ITSN1-залежних процесів у клітині.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які ставляться до кандидатських дисертацій. Оцінюючи роботу Паньківського С.В., можна зробити висновок, що вона є цілісним завершеним дослідженням, що значно поглиблює розуміння клітинних процесів, в яких функціонують білки-скафолди та РНК-зв'язуючі білки. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів розглянута дисертаційна робота повною мірою відповідає вимогам п.п. 9, 11, 12, 13, «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор – Паньківський Сергій Володимирович – заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
завідувач відділу нейрохімії
Інституту біохімії імені О.В. Палладіна

Борисова Т.О.

Підпис Борисова Т.О.
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
"07" 10 2020 р.

