

**ВІДГУК**  
**офіційного опонента**

на дисертаційну роботу ПАНЬКІВСЬКОГО Сергія Володимировича  
"Пошук та характеристика ядерних функцій протеїна ендоцитозу ITSN1",  
представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата  
біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Вивчення молекулярних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації, в основі якої лежить утворення мультимолекулярних комплексів за участі адаптерних (скефолдних) білків, є важливим напрямком сучасної молекулярної біології. Дисертаційна робота С. В. Паньківського присвячена дослідженню взаємодії одного з таких білків – інтерсектину 1 (ITSN1) – з ядерними РНК-зв'язувальними білками. Хоча участь ITSN1 в ендоцитозі та багатьох інших цитоплазматичних процесах, у тому числі пов'язаних зі злоякісною трансформацією, непогано вивчена, функціональна роль цього білка у клітинному ядрі досі залишається загадковою. Тему дисертаційної роботи, яка дозволяє краще зрозуміти цю роль, слід безперечно визнати **актуальною** як у фундаментальному, та 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 154 сторінки, ілюстрована 44 рисунками і 3 таблицями. Список використаних джерел, в якому добре представлені роботи останніх років, містить 220 посилань. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 12 публікацій, у тому числі 3 статті у фахових наукових журналах. 2 статті надруковано в журналах, які входять до наукометричної бази даних Scopus, серед них 1 – у журналі першого квартилю (імпакт-фактор вище

7). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо характеристики білків родини інтерсектинів та РНК-зв'язувальних білків, зокрема білка SAM68, є стислим, але змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано надзвичайно широкий набір сучасних методів молекулярної біології, описаних у Розділі 2: рекомбінантні методи (клонування ДНК, створення плазмідних конструкцій, транзійтна експресія, отримання та очищення рекомбінантних білків), гель-електрофорез, вестерн-блотинг, методи дослідження білок-білкових взаємодій (преципітація білкових комплексів, наближене лігування і аналіз білок-білкових взаємодій за допомогою мікротрубочок), генний нокдаун на основі РНК-інтерференції, флуоресцентна і атомно-силова мікроскопія, ЯМР-спектроскопія, біоінформатичні методи тощо. Висока якість проведених експериментів не викликає сумніву.

Робота С. В. Паньківського мала на меті дослідити взаємодії інтерсектину ITSN1 з РНК-зв'язувальними білками і з'ясувати функціональну роль ITSN1 у клітинному ядрі. Отримані результати представлені у двох підрозділах розділу 3.

У першому підрозділі автор насамперед наводить дані, які підтверджують локалізацію ITSN1 не тільки у цитоплазмі, а і в клітинному ядрі, а також свідчать про те, що як EH-, так і SH3-домени цього білка можуть опосередковувати його транспорт до ядра. Проведений автором біоінформатичний аналіз дозволив виявити низку ядерних білків, що потенційно можуть бути партнерами для взаємодії з ITSN1. Для трьох таких білків, що відносяться до категорії РНК-зв'язувальних, отримано докази щодо їхньої взаємодії з SH3-доменами

ITSN1 *in vitro*. Продемонстровано також, що досліджені РНК-зв'язувальні білки здатні взаємодіяти з низкою інших білків – регуляторів ендоцитозу та реорганізації актинових філаментів.

У другому підрозділі автор зосередився на більш детальному аналізі взаємодій одного із досліджених у першому підрозділі білків – регулятору транскрипції, сплайсингу та транспорту мРНК SAM68 – з ITSN1. Автором було підтверджено взаємодію двох очищених білків *in vitro*, а також – за допомогою використання мікротрубочок як носіїв – у клітині. За допомогою методу наближеного лігування отримано докази ко-локалізації двох білків у клітинах HeLa. Визначено конкретні домени/мотиви у складі двох білків, які відповідають за взаємодію. Показано також, що адаптерний білок GRB2 конкурує з ITSN1 за SAM68, а у присутності ITSN1 знижується рівень агрегації SAM68 (зростає його розчинність). Аналогічний ефект спостерігався у присутності РНК.

Аналізуючи електрофоретичну рухливість РНК у присутності досліджуваних білків, автор отримав несподівані результати, які свідчать про невідому раніше взаємодію ITSN1 з РНК. У наступних експериментах таку взаємодію було підтверджено за допомогою атомно-силової мікроскопії. Було також з'ясовано, що за взаємодію з РНК відповідає домен SH3D інтерсектину, у складі якого за допомогою двовимірної ЯМР-спектроскопії визначено конкретні амінокислотні залишки, хімічні зсуви яких змінюються у присутності одноланцюгових нуклеїнових кислот.

Повернувшись до аналізу взаємодії ITSN1 і SAM68, автор показав, що нокдаун гена *ITSN1* призводить до збільшення рівня агрегації SAM68 у клітині – рівня накопичення цього білка у SAM68-специфічних ядерних тільцях. Відповідно, транз'єнтна експресія делеційної SH3-вмісної форми ITSN1 після нокдауну викликала дисоціацію SAM68-специфічних

ядерних тілець. Додаткові експерименти продемонстрували, що *ITSN1* не локалізується у тільцях, збагачених SAM68, а у самих таких тільцях відсутня зріла мРНК. Нарешті, автор провів експерименти, що проливають світло на функціональне значення взаємодії між *ITSN1* і SAM68: було показано, що нокдаун гена *ITSN1* призводить до змін співвідношень сплайс-варіантів низки генів, сплайсинг мРНК яких залежить від SAM68. Зокрема, продемонстровано, що *ITSN1* може бути залученим до регуляції синтезу протоонкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей і формулює гіпотетичну модель, що базується на отриманих даних і пояснює функціональні взаємозв'язки між інтерсектином *ITSN1* і регулятором сплайсингу SAM68.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи С. В. Паньківського полягає в тому, що в ній отримані нові вагомні результати щодо взаємодій, у які вступає скефолдний білок *ITSN1*, та функціональної ролі таких взаємодій. Таким чином, представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про молекулярні механізми функціонування інтерсектинів, а також сприяють розумінню ролі цих білків у канцерогенезі. 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.

Використання сучасних експериментальних методів, застосування підходів, що доповнюють один одного, ретельне виконання експериментів і не менш ретельний аналіз отриманих даних, 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 логічно будувати власне дослідження та вирішувати складні дослідницькі завдання, аналізувати свої результати та узагальнювати їх. Разом з тим, до дисертаційної роботи С. В. Паньківського виникли наступні **зауваження та запитання**, які важко назвати принциповими.

1. У дисертації продемонстровано взаємодію ITSН1 з РНК-зв'язувальними білками, які, у свою чергу, і це також показано в роботі, здатні взаємодіяти з білками, залученими до реорганізації актинових філаментів. Добре відомо, що ITSН1 залучений до регуляції полімеризації актинових філаментів у цитоплазмі. Але відомо також, що актинові філаменти присутні і в клітинному ядрі (що вони там роблять залишається недостатньо зрозумілим). Отже, чи можна припустити, що важлива роль, яку виконує ITSН1 в ядрі і яка в цій роботі поки що залишилась поза увагою, як раз і полягає у регуляції полімеризації ядерного актину? Чи можна це розглядати як один із напрямків подальших досліджень?

2. У роботі показано, що видалення пролінового мотиву білка SAM68 призводить до зростання кількості білка у SAM68-специфічних ядерних тільцях. Викликає подив твердження автора при обговоренні цих результатів про те, що "проліновий мотив P0 білка SAM68 бере участь у

формування ядерних тілець SAM68". Напевно, це твердження просто невдало сформульовано.

3. У тексті роботи зустрічаються пунктуаційні і друкарські помилки.

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

**Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій.** Дисертаційна робота Паньківського Сергія Володимировича "Пошук та характеристика ядерних функцій протеїна ендцитозу ITS1" є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, глибиною розкриття поставлених проблем, логічністю і обґрунтованістю висновків 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 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