

## ВІДЗИВ

### офіційного опонента

на дисертаційну роботу МОРДЕРЕРА Дмитра Євгеновича "Ідентифікація  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування скафолдного білка ITSN1 та його взаємодії з цитоскелетним білком STOP у нейронах", представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Вивчення молекулярних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації, що залежить від утворення мультимолекулярних комплексів за допомогою скафолдних білків, є надзвичайно важливим напрямком сучасної молекулярної біології, який має велике значення для розуміння закономірностей регуляції перебігу клітинних процесів. Дисертаційна робота Д. Є. Мордерера присвячена дослідженню  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування скафолдного білка інтерсектину 1 (ITSN1) та його взаємодії з білками-партнерами у нейронах. Оскільки, з одного боку, зміни експресії гена *ITSN1* пов'язують з розвитком низки нейродегенеративних захворювань, а з іншого – питання щодо участі ITSN1 у специфічних для нейронів процесах залишаються недостатньо з'ясованими, тему дисертаційної роботи слід безперечно визнати **актуальною** як з фундаментальної, так і з прикладної точки зору.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, продовжуючи багаторічні дослідження відділу у напрямі вивчення скафолдних білків.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 139 сторінок основного тексту, ілюстрована 39 рисунками і 4 таблицями, список використаних джерел містить 224 посилання, серед яких переважають роботи останніх років. В цілому дисертація добре оформлена.

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 13 публікацій, в тому числі 5 статей у фахових наукових журналах. При цьому всі статті надруковано в журналах, що входять до наукометричної бази даних Scopus

(серед них дві публікації в журналах з імпакт-фактором на рівні 2,1 та 4,2). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо загальних властивостей скафолдних білків, властивостей білка ITSN1 та його функціональної ролі є стислим, але надзвичайно змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів молекулярної і клітинної біології, описаних у Розділі 2: клонування фрагментів кДНК і синтез рекомбінантних білків, культивування клітин *in vitro* та їхня короткотривала трансфекція, генний нокдаун за допомогою РНК-інтерференції, афінна хроматографія, преципітація білкових комплексів із використанням GST-злитих білків, імунопреципітація та вестерн-блотинг, мас-спектрометрія MALDI-TOF і тандемна мас-спектрометрія, конфокальна і широкопольна флуоресцентна мікроскопія, морфометричний аналіз нейронів та інші. Загальна висока якість проведених експериментів не викликає сумніву.

Робота Д. Є. Мордерера мала на меті дослідити взаємодії ITSN1 з іншими білками у нейронах, а також з'ясувати його вплив на розвиток нейронів і  $Ca^{2+}$ -залежні шляхи регуляції його активності. Отримані результати представлені у трьох підрозділах розділу 3.

Перший підрозділ присвячено пошуку нових білків-партнерів ITSN1 у нейронах головного мозку миші. Автором переконливо доведено, за допомогою методів мас-спектрометрії, а також преципітації білків лізату головного мозку миші з GST-злитими SH3-доменами і імунопреципітації з наступним вестерн-блотингом, що один із SH3-доменів ITSN1 (домен SH3A) здатен взаємодіяти з асоційованим з мікротрубочками білком STOP (відомим також як MAP6). За допомогою флуоресцентної мікроскопії продемонстровано, що два білки частково колокалізуються у нейронах гіпокампу щурів. Водночас, отримані дані свідчать про те, що взаємодія ITSN1 і STOP не призводить до втрати асоціації останнього з мікротрубочками.

У другому підрозділі представлено результати дослідження впливу ITSN1 на кількість і довжину дендритів у клітин первинної культури нейронів гіпокампу щурів. Основним методом було пригнічення експресії гена *ITSN1* за допомогою РНК-інтерференції із наступним морфологічним аналізом. Показано, що рівень білка ITSN1 у клітинах практично не впливає на загальну кількість дендритних закінчень, але справляє деякий вплив на сумарну довжину дендритів.

Третій підрозділ присвячено дослідженню шляхів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної регуляції активності ITSN1. Перша спроба знайти такі шляхи призвела до негативного результату (який у даному випадку – теж результат): було показано, що іони  $\text{Ca}^{2+}$ , які здатні зв'язуватись з ЕН-доменами ITSN1, не впливають на спорідненість цих доменів до одного з відомих партнерів ITSN1 – білка епсину 1. Другий напрямок роботи був пов'язаний із дослідженням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування ITSN1 у нейронах – у цьому напрямку автору вдалося отримати низку цінних даних. Проведена кіназна реакція *in vitro* з використанням кальмодулін-зв'язувальних білків, отриманих з лізату головного мозку миші, продемонструвала факт  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування. На наступному етапі, за допомогою тандемної мас-спектрометрії, автор встановив п'ять конкретних сайтів такого фосфорилування.

У Розділі 4, який присвячено обговоренню отриманих результатів, автор, аналізуючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує схему можливої участі білків ITSN1 та STOP у формуванні дендритного дерева нейронів.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи Д. Є. Мордерера полягає в тому, що в ній отримані нові результати щодо білок-білкових взаємодій за участі білка ITSN1 у нейронах і впливу ITSN1 на морфологію нейронів, а також показано наявність  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1 та визначено сайти такого фосфорилування у складі білка. Представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про молекулярні механізми регуляції активності

нейронів. Отримані результати будуть також сприяти з'ясуванню механізмів нейродегенеративних захворювань і пошуку нових терапевтичних препаратів для їхнього лікування. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузі молекулярної біології, а також у практичних розробках, що проводяться в академічних, освітніх та медичних установах, які працюють над вивченням систем внутрішньоклітинної сигналізації і пошуком нових підходів у лікуванні нейродегенеративних 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 високий рівень кваліфікації автора – володіння сучасними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх. Разом з тим, до дисертаційної роботи Д. Є. Мордерера виникли наступні **зауваження та запитання.**

1. Не зовсім зрозуміло, з якою метою автор проводив аналіз будови дендритного дерева за процедурою Шолля. По-перше, результати, представлені на рис. 3.19, вказують на дуже невеликі відмінності між контрольними нейронами і такими, де була пригнічена експресія *ITSN1* – візуально два графіки розрізняються не суттєво, а відповідні коефіцієнти регресії наведено без зазначення похибки. По-друге, висновок такого аналізу полягає в тому, що "пригнічення експресії *ITSN1* викликає скорочення довжини дендритів" (стор. 85) – але навіщо підтверджувати параметр (довжину дендритів), який перед цим було визначено безпосередньо?

2. Незрозумілою є фраза на стор. 89 стосовно індукції синтезу білка за допомогою ПТГ. Як така індукція може забезпечуватись *репресією* промотора? Як з промотора може зніматись *lac*-оператор?

3. Виникає питання, у чому причина наявності досить великої кількості зайвих смуг на доріжках 5 гелів на рис. 3.21, 3.22 – у препаратах білків, отриманих за допомогою афінної хроматографії?

4. Із підпису до рис. 3.23 і 3.24 залишається незрозумілим, що було нанесено на доріжки гелю (частини А рисунків) і в яких концентраціях додавались  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$ . Крім того, у тексті зазначено, що при аналізі гелів, наведених на рисунках, "кількість білка, що зв'язався, визначалась як відношення між сигналами GST-EH1-EH2 та His-Epsin1-C". Але що приймалось за сигнал? Адже інтенсивність смуг епсину на обох рисунках є очевидно *меншою* за таку інтерсектину чи його доменів, хоча відношення кількості інтерсектину до епсину є меншим одиниці на частинах Б обох рисунків.

5. У роботі зустрічаються невдалі вирази та деякі інші недоліки оформлення:

– у тексті іноді зустрічаються друкарські, пунктуаційні і стилістичні помилки, а також численні англіцизми у порядку розташування слів ("SH3 домени", "*in vitro* реакція" і т.п.);

– у підрозділі 2.16 допущено очевидну помилку у концентраціях EGTA,  $MgCl_2$  та  $CaCl_2$ ;

– у підписі до рис. 3.29 допущено очевидну помилку – найвищий пік ніяк не може відповідати "первинному нейрону".

Зрозуміло, що наведені зауваження не можна назвати принциповими. Відповідно, вони не знижують загальної високої оцінки розглянутої роботи.

**Оцінюючи роботу в цілому**, можна констатувати, що дисертація Д. Є. Мордерера є завершеним дослідженням в актуальній області молекулярної біології та містить ряд важливих наукових і практичних результатів.

Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну одержаних результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування, вважаю, що дисертаційна робота Мордерера Дмитра Євгеновича “Ідентифікація  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування скафолдного білка ITSN1 та його взаємодії з цитоскелетним білком STOP у нейронах” **повністю відповідає вимогам** постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 “Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

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

А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

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