

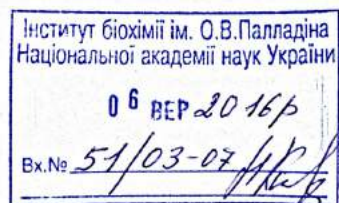
**ВІДГУК
ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

на дисертаційну роботу Базалія Андрія Вікторовича
«РОЛЬ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk/CIN85 У РЕЦЕПТОР-ЗАЛЕЖНИХ
МЕХАНІЗМАХ АКТИВАЦІЇ NADPH-ОКСИДАЗИ І
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО СИГНАЛЮВАННЯ У ПУХЛИННИХ
КЛІТИНАХ»

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.04 - біохімія

Сигнальні системи клітини відіграють провідну роль у підтримці нормального клітинного гомеостазу, а порушення сигнальних механізмів клітини є однією з головних молекулярних подій в етіології і патогенезі багатьох захворювань людини і, зокрема, раку.

Ключову роль у трансмембранному перетворенні і подальшому внутрішньоклітинному проведенні сигналів відіграють сигнальні молекули, що опосередковують процеси посттрансляційної модифікації клітинних протеїнів шляхом їх фосфорилування-дефосфорилування. Серед компонентів сигнальних мереж чільне місце займають адаптерні протеїни, які в багатьох випадках не мають ензиматичної активності і натомість опосередковують протеїно-протеїнові взаємодії, утворюючи макромолекулярні комплекси. Слід зазначити, що цей процес є надзвичайно динамічним, і архітектура сигнальних комплексів змінюється залежно від контексту позаклітинних стимулів. Від складу сигнальних комплексів залежить і подальший напрямок проходження сигналу, а отже і функціональна відповідь клітини. Все це стосується і адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85, що є представником окремої родини SH3-вмісних адаптерних протеїнів які виконують важливу роль у ліганд-опосередкованому ендоцитозі рецепторних тирозинових протеїнкіназ, мітогенному сигналюванні.



Експериментальні дані останніх років свідчать, що рецептор-залежне зростання рівня внутрішньоклітинного пероксиду гідрогену (H_2O_2), – нового вторинного посередника, – не тільки забезпечує посилення і подовження активності рецептор-залежних сигнальних каскадів, але й пов'язане з регулюванням біологічних відповідей клітин та розвитком низки системних патологічних станів, регуляції апоптозу та інше. Ефекторними ензимами, залученими до продукування активних форм кисню (АФК), є представники родини мембранних NADPH-оксидаз, що активуються внаслідок утворення NADPH-оксидазних комплексів, одним із компонентів яких є протеїн Tks4, ідентифікований раніше як зв'язувальний партнер Ruk/CIN85. Таким чином абсолютно ґрунтованою є ідея, щодо участі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі генерування АФК з витікаючими звідси наслідками.

З огляду на зазначене актуальність запропонованого наукового дослідження не викликає сумнівів.

Дисертаційну роботу Базалія А. В. виконано у відповідності з планами наукових досліджень лабораторії сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

В процесі виконання роботи автором отримано низку пріоритетних даних.

Доведено, що продукування АФК пухлинними клітинами, залежне від NADPH-оксидазних комплексів, позитивно корелює з рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Із застосуванням прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії виявлено локалізацію Ruk/CIN85 в клітинних компартментах, де відбувається генерування H_2O_2 , а саме у «dot»-подібних везикулярних структурах.

Вперше встановлено, що пригнічення активності NADPH-оксидаз і, відповідно рівня продукування АФК, призводить до реверсії тривалої EGF-індукованої активації Akt кінази на тимчасову в клітинах зі стабільною експресією Ruk/CIN85.

За допомогою ПЛР у реальному часі встановлено, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну

Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів *NOX*.

Взаємодію Ruk/CIN85 з ендогенним протеїном Tks4, організатором NADPH-оксидазного комплексу, підтверджено за допомогою реакції імунопреципітації та детально проаналізовано за допомогою GST *in vitro* pull down аналізу в лініях клітин різного тканинного походження.

Отримані результати мають і перспективу практичного застосування. Отримані дані є потенційно важливими для пошуку і ідентифікації нових редокс-залежних мішеней для розробки відповідних фармакологічних препаратів скерованої дії. Отримана генетична конструкція химерного протеїну Ruk/CIN85-HyPer, може бути запропонована для визначення локалізованого продукування H_2O_2 у живих клітинах.

Матеріали дисертаційної роботи можуть бути корисними при підготовці спецкурсів з біохімії та клітинної біології для студентів біологічних факультетів університетів.

Достовірність наукових положень, що виносяться на захист, базується на великому масиві одержаних експериментальних даних.

Роботу побудовано за традиційною для дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук схемою. Вона складається із таких розділів: вступ, аналітичний огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналіз та обговорення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел.

Дисертаційну роботу викладено на 125 сторінках машинописного тексту. Вона містить 34 рисунки та 1 таблицю. Список використаних джерел літератури охоплює 135 джерел.

Вступ містить достатню аргументацію актуальності роботи, постановку мети та відповідних завдань дослідження, обґрунтування наукової новизни дослідження та практичної цінності отриманих результатів, що виносяться на захист. У вступі також зазначено особистий внесок здобувача.

Розділ “Огляд літератури” складається з трьох підрозділів. Перший підрозділ присвячено загальним принципам будови та функціонування

сигнальних мереж клітин. Розглянуто принципи модульної будови сигнальних протеїнів. Значну увагу присвячено адаптерним/риштувальним протеїнам як ключовим центрам організації сигнальних мереж клітин. Особливу ж увагу присвячено структурно-функціональній організації адаптерного протеїна Ruk/CIN85, особливостям його взаємодії з протеїнами-партнерами та ролі у внутрішньоклітинних сигнальних процесах, як то регуляції внутрішньоклітинного транспорту везикул, апоптозу, процесах клітинної адгезії, міграції та інвазії.

Окремий підрозділ присвячено ролі активних форм кисню (АФК) у регулюванні внутрішньоклітинного сигналювання. Розглянуто основні джерела АФК у тваринних клітинах, ензими залучені до їхнього генерування, а саме родину NADPH-оксидаз (Nox) - їхню будову й механізми рецептор-залежної активації.

Розглянуто сучасні уявлення щодо молекулярних механізмів АФК-опосередкованої сигнальної трансдукції та ролі пероксиду гідрогену як нового вторинного посередника в нормальних та пухлинних клітинах.

Матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертанта та здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу.

При виконанні роботи дисертантом застосовано широкий спектр методів сучасної молекулярної та клітинної біології, цитології, біохімії та імунології які представлено у розділі “Матеріали і методи досліджень”. Цей розділ демонструє відмінне володіння автором сучасними методичними підходами.

Розділ “Результати досліджень” складається з шести підрозділів які логічно пов’язані між собою.

Перший підрозділ присвячено дослідженню зв’язку між рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та продукуванням АФК пухлинними клітинами за участі NADPH-оксидазного комплексу для чого було застосовано інгібітор збирання NADPH-оксидазних комплексів апоцинін.

Дисертантом встановлено, що клітини з високим рівнем експресії Ruk/CIN85 характеризуються суттєво вищою інтенсивністю продукування АФК. Однак чим можна пояснити той факт, що в клітинах з низьким рівнем ектопічної експресії Ruk/CIN85 (клон D4) продукування АФК виявилось меншим ніж у контрольних вихідних клітинах?

Цікаво, що продукування АФК знижується під дії апоциніну приблизно на 70%, натомість пригнічення експресії Ruk/CIN85 за допомогою специфічних shRNA призводить майже до 100% пригнічення продукування АФК. Чим це можна пояснити?

На моделях пухлинних клітин MDA-MB-231 та HT-29 підтверджено, що пригнічення експресії ендогенної форми Ruk/CIN85 також призводить до 100% пригнічення продукування АФК.

Отримані дані свідчать на користь висловленого припущення про можливу регуляторну роль Ruk/CIN85 у функціонуванні NADPH-оксидазного комплексу, що в свою чергу може вносити вклад в посилення трансформувального потенціалу пухлинних клітин.

Надалі дисертантом з застосуванням конфокальної мікроскопії було досліджено чи збігається локалізація Ruk/CIN85 в клітині з місцями продукування H_2O_2 у реальному часі. Для цього було створено конструкт що кодує химерний флуоресцентний сенсор H_2O_2 , Ruk/CIN85-HuPer. Встановлено, що на відміну від дифузного характеру локалізації протеїну HuPer в контрольних клітинах HEK293, флуоресценція Ruk/CIN85-HuPer чітко детектується у вигляді зелених «dot»-подібних утворень різного розміру, що нагадують везикулярні структури. Цікаво, що при цьому спостерігалось зростання концентрації H_2O_2 в часі, згідно зміні кольору від зеленого через жовтий до червоного. А чи були структури де відбувалося зменшення концентрації H_2O_2 в часі, адже напевне цей процес має бути динамічним? І чому всі виявлені структури початково мали тільки зелене забарвлення, що вказує на низький рівень в найближчому оточенні гідрогену пероксиду.

Отримані дані дозволили припустити участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у локалізованому продукуванні H_2O_2 .

З огляду на отримані раніше дані, щодо впливу підвищення експресії Ruk/CIN85 на фенотип злякисних клітин, зокрема вплив на рухливість, адгезивні властивості, ріст у напіврідкому агарі, забезпечення швидкої і тривалої EGF-залежної активації Erk1/2 та Akt і Src кіназ, розвиток ознак ракових стовбурбурових клітин, надалі було досліджено роль АФК у набутті клітинами цих властивостей.

Встановлено, що пригнічення продукування АФК клітинами з надекспресією Ruk/CIN85 при обробці апоциніном призводило до реверсії тривалої активації кінази Akt на тимчасову з одночасним посиленням автофосфорилування рецептора EGF. При цьому подібних змін в контрольних клітинах не зареєстровано. Отримані дані вказують на потенційну роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у редокс-залежних механізмах, які забезпечують оптимальний рівень автофосфорилування EGFR, необхідний для підтримання тривалої активації кінази Akt.

Крім того, встановлено, що апоцинін більш як на 50% пригнічував міграцію клітин з високим вмістом Ruk/CIN85 і, натомість, майже не впливав на контрольні клітини.

Як відомо, рецептор-опосередковане регулювання NADPH-оксидаз і посилення продукування АФК супроводжується змінами редокс-залежного сигналювання, що, в кінцевому рахунку, може призводити до змін у диференційній експресії окремих гомологів NOX. Відповідно, було досліджено експресію різних форм каталітичних субодиниць NADPH-оксидазних комплексів (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1, Duox2) та субодиниці p22^{phox}, залежно від рівня експресії Ruk/CIN85.

Дисертантом встановлено, що в стабільних субклонах аденокарциномних клітин грудної залози людини лінії MCF-7 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 експресуються лише чотири гени – *NOX1*, *NOX2*, *NOX5* та *Duox2*. Цікаво, що надекспресія Ruk/CIN85 супроводжується підвищенням експресії *NOX1*, *NOX2* та *Duox2*. Натомість, при цьому

спостерігається пригнічення експресії NOX5 та p22^{phox}. Таким чином, отримані дані вказують, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів NOX.

Останній підрозділ присвячено дослідженню особливостей взаємодії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 із субодиницею-організатором NADPH-оксидаз, протеїном Tks4, що був ідентифікований раніше методом мас-спектрального аналізу як протеїновий партнер Ruk/CIN85.

Встановлено, що з трьох SH3 доменів Ruk/CIN85 лише SH3A домен преципітує ендogenous форму Tks4. Крім того, встановлено, що SH3B домен екранує зв'язувальну поверхню SH3A домену для пролін-багатих послідовностей Tks4 в клітинах LLC. На основі отриманих даних дисертант робить припущення, що фосфорилування відповідних залишків Ser/Thr, локалізованих як у районі SH3AB доменів, так і з С-кінця від Pro-багатого району в ендogenous протеїні Ruk/CIN85, опосередковане вхідним сигналом, може призводити до дестабілізації автоінгібіторної конформації протеїну і забезпечувати можливість утворення комплексів.

Назвичайно цікаві дані отримано, щодо специфічності взаємодії інших ізоформ Tks4 (90 та 160 кДа) з SH3 доменами Ruk/CIN85, що в тому числі залежить і від типу клітини.

В останньому розділі автором проведено узагальнення та глибокий аналіз отриманих експериментальних даних з урахуванням даних джерел літератури.

В цілому ж висновки і основні положення дисертаційної роботи Базалія Андрія Вікторовича відповідають меті та поставленим завданням дослідження, повністю базуються на власних результатах досліджень. Результати експериментів статистично оброблені, а їх достовірність не викликає сумніву.

Результати дисертаційної роботи Базалія А. В. у повному об'ємі опубліковано в провідних фахових виданнях, рекомендованих для захисту кандидатських дисертацій та пройшли всебічну апробацію на вітчизняних та

міжнародних форумах. В цілому по темі дисертації опубліковано 12 наукових робіт, 6 з яких представлені у вигляді статей в профільних наукових виданнях. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

До роботи є деякі зауваження та побажання.

1. В розділі «Матеріали і методи» не висвітлено загальну ідею використання флуоресцентного протеїну Hupег як сенсора вмісту H_2O_2 і тому виникають запитання методичного характеру. В підрозділі «Аналіз продукування H_2O_2 конфокальною мікроскопією у реальному часі» навіть на зазначено, що клітини було трансфіковано конструкцією *Ruk/CIN85-Hyper-N*.
2. Згідно даних конфокальної мікроскопії флуоресценція *Ruk/CIN85-Hupег* в клітинах HEK293, тимчасово трансфікованих *Ruk/CIN85-Hyper-N1* детектується у вигляді зелених «dot»-подібних утворень різного розміру. Чи це збігається з характером клітинної локалізації *Ruk/CIN85* без Hupег (згідно даних літератури чи власних даних)? І чи можна виключити імовірність впливу Hupег на локалізацію *Ruk/CIN85*.
3. Чим можна пояснити різну динаміку люмінесценції в часі в експериментах по визначенню продукування H_2O_2 (3.4, 3.5, 3.6). Чому в клітинах MCF-7-G10 вона не залежить від часу інкубації, а в клітинах MDA-MB-231 та HT-29 спостерігається багаторазове збільшення люмінесценції в часі (протягом 30 хв.)?
4. Чи порівнювали рівень експресії *Ruk/CIN85* в клітинах MDA-MB-231 та HT-29?, адже за даними представленими на Рис.3.5 та 3.6. вміст H_2O_2 в клітинах HT-29 більш ніж в 10 разів перевищує такий в клітинах MDA-MB-231, однак згідно даних імуноблот-аналізу вмісту *Ruk/CIN85* в лізатах клітин складається враження, що представленість *Ruk/CIN85* в HT-29 значно менша, що не на користь кореляції між рівнем експресії *Ruk/CIN85* та вмістом H_2O_2 .

5. Варто уникати деталізації в висновках. «Продемонстровано, що попередня обробка клітин MCF-7 субклубу G10 інгібітором збирання NADPH-оксидазного комплексу апоциніном і пасткою для АФК N-ацетилцистеїном призводить до реверсії тривалої активації кінази Akt на тимчасову з одночасним посиленням автофосфорилування рецептора EGF». Можна «Продемонстровано, що пригнічення продукування АФК в клітинах з високим рівнем експресії Ruk/CIN85 призводить до реверсії тривалої активації кінази Akt на тимчасову з одночасним посиленням автофосфорилування рецептора EGF».

Зауваження, запитання та побажання, що виникли під час рецензування дисертаційної роботи ніяким чином не впливають на загальне дуже позитивне враження щодо представленої до захисту роботи.

Вважаю, що робота за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною отриманих результатів та всебічним аналізом 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 Базалій Андрій Вікторович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія

Офіційний опонент:

Завідувач відділу сигнальних систем клітини

Інституту молекулярної біології і генетики

НАН України, доктор біологічних наук,

професор

В.В.Філоненко.

