

Інститут біохімії ім. С.В.Палладіна
Національної академії наук України
14 вер
№ 59/03-07/11

ВСТІВ

офіційного оцінювача

на дисертаційну роботу **Баталія А. В. «Роль адаптерного протеїну Rak/CTN85 у рецептор-залежних механізмах активації NADPH-оксидати і внутрішньоклітинного сигналювання у пухлинних клітинах»**, представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04–біохімія

Незважаючи на інтенсивне дослідження особливостей функціонування сигнальних шляхів у злоякісно трансформованих клітинах, їх роль у забезпеченні неконтрольованої проліферації, міграції та інвазії залишається недостатньо зрозумілою. Проблема ускладнюється модульністю організації сигнальних протеїнів, можливістю утворення багатоконпонентних нуклеопротеїнових комплексів із залученням адаптерних структур, регулювання шляхами їх взаємодії з різкомембранними клітинними структурами. Протягом останніх років значну увагу дослідників привертють релокс-залежні сигнальні шляхи. Хоча уявлення щодо значення АФК у процесі канцерогенезу залишаються суперечливими, здатність таких представників, як супероксид та гідрогену пероксид, функціонувати у ролі вторинних посередників вказує на їх можливе залучення до контролювання процесів апоптозу, метастазування, апоптозу. Проте недостатньо дослідженою залишається її компоненти сигнальних каскадів, що можуть бути, з одного боку, джерелом продукування АФК, а з іншого - мішенями їх регуляторної дії. У зв'язку з цим тема дисертаційної роботи, присвячена в'ясуванню можливого зв'язку між адаптерним протеїном Rak/CTN85 та активністю NADPH-оксидати у організації сигнальних шляхів у пухлинних клітинах є актуальною.

Тема дисертаційної роботи є частинною зареєстрованих фундаментальних наукових досліджень, що протягом 2010 -2015 років виконувались у лабораторії сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Роботу побудовано за традиційною схемою, викладено на 125 сторінках, достатньо ілюстровано, список використаних джерел включає 135 найменувань, серед яких переважають роботи останніх років. Огляд літератури складеться з 3-х глав, у яких послідовно висвітлено такі питання, як принципи будови та функціонування

сигнальних мереж клітин, структурно-функціональна організація та біологічна роль адаптерного протеїну Rsk/CIN85, протейн-партнер Rsk/CIN85 та його функції у клітині, будова і механізми регулятор-залежної активації протейнів родини NADPH-оксидаз (Nox), АФК-залежне регулювання сигнальних шляхів у пухлинних клітинах.

Зміст представленої автореферату відповідає основним положенням дисертаційної роботи. Результати роботи опубліковано у 6-и статтях у фахових виданнях та апробовано на вітчизняних і міжнародних конференціях та з'їздах.

Свідченням достатнього ступеню обґрунтованості та достовірності отриманих у дисертації результатів та зроблених висновків є високий методичний рівень роботи. Експерименти виконано із застосування не лише біохімічних методів (електрофорез ДНК в агарозному гелі, електрофорез протейнів в ПААГ, Вестерн-блот аналіз, з'явне очищення GST-протейнів на глутатіон-сефарозі, визначення продуктування АФК люмінесцентним методом), але й методів генної інженерії, клітинної та молекулярної біології, імунології (зокрема, отримання рекомбінантних лентивірусних векторів для прицільної експресії Rsk/CIN85 методом РНК-інтерференції та інфікування ними пухлинних клітин, експресія рекомбінантних протейнів, кон'югованих з GST, в бактерійній системі, полімерна ланцюгова реакція у реальному часі, культивування клітин ссавців, конфокальна мікроскопія у реальному часі, отримання поліклональних антитіл до адаптерного протеїну Tks4, імунопреципітація протейнів).

Для проведення експериментальних досліджень переважно використано низькоінвазивні клітини аденокарциному грудної залози людини лінії MCF-7, у яких ендогенний рівень експресії адаптерного протеїну Rsk/CIN85 є низьким. Оскільки, згідно попередньо отриманих даних, у зонах інвазивного росту пухлини грудної залози рівень експресії Rsk/CIN85 є підвищеним, обґрунтованим є вибір стабільних трансфектантів з надекспресією цього протеїну як моделі для в'ясування його залучення до регуляції продуктування АФК та до формування відповіді пухлинних клітин, зокрема, активацію сигнальних молекул та посилення міграційних властивостей.

У роботі отримано низку важливих даних, які є свідченням її новизни. Показано, що продуктування АФК клітинами лінії MCF-7 є тим інтенсивнішим, чим вищим є рівень експресії Rsk/CIN85. Доказом продуктування АФК саме NADPH-оксидазами є пригнічення процесу як за використання інгібітора збирання еніміних комплексів

апоптозі, так і у разі пригнічення експресії гену *Rak/CIN85* методом siRNA-інтерференції. Доведено та оцінено експресію чотирьох генів *NOX*, що кодують різні форми каталітичних субодиниць NADPH-оксидазних комплексів – *NOX1*, *NOX2*, *NOX5* та *Duox2*. Вперше з використанням рекомбінантного злитого протеїна *Rak/CIN85* – *HyPet* візуалізовано спілокалізацію *Rak/CIN85* та генерування H_2O_2 у клітинах MCF-7. Показано, що пригнічення апоптозним продуктування АФК у клітинах субклону G10 з високим рівнем експресії *Rak/CIN85* супроводжується змінами як на рівні активності сигнальних молекул (модифікація динаміки EGF-залежної активації Akt кішки, посилення рівня автофосфорислювання EGF рецептора), так і на клітинному рівні (пригнічення міграції). Методами імуопреципітації та GST pull-down аналізу продемонстровано можливість взаємодії SH3 доменів *Rak/CIN85* з складеним адаптерним протеїном *Tsk4* – організатором NADPH-оксидазних комплексів у клітинах різного тканинного походження. Показано, що за дії EGF у клітинах MCF-7 збільшується кількість *Tsk4*, що преципітується GST-SH3A доменом *Rak/CIN85*.

Отримані у роботі результати мають практичне значення, оскільки вказують на можливість розширення варіантів впливу на проліферацію та інвазію пухлинних клітин з використанням таких мішеней, як *Rak/CIN85*, NADPH-оксидазні комплекси, адаптерний протеїн *Tsk4*. Отримана генетична конструкція, що кодує протеїн *Rak/CIN85* – *HyPet* може бути використана для візуалізації продуктування гідрогену пероксиду у клітинах.

До роботи виникають певні питання та зауваження.

1. Яким є механізм дії апоптозину, що є конкретною мішенню його дії і наскільки специфічним є інгібіторний вплив на різні форми NADPH-оксидаз?
2. Згідно даних, представлених на Рис. 3.2, продуктування АФК на достатньо високому рівні властиве не лише клітинам MCF-7 з надекспресією *Rak/CIN85*, але й контрольним клітинам, у яких вміст *Rak/CIN85* не детектується. Чи пригнічується продуктування АФК у контрольних клітинах апоптозином і чи варто при дослідженні редокс-залежних шляхів враховувати ті, що не залежать від активності NADPH-оксидаз?
3. На думку автора, який механізм є переважним для пояснення посиленого продуктування АФК у клітинах з надекспресією *Rak/CIN85* – утворення NADPH-

оксидантних комплексів за участі Trk4 чи модифікованій патерні експресії різних ізоформ NOX?

4. На жаль, Розділ 4 дещо переобтяжений заповненнями з літератури схемами замість аналізу власних експериментальних даних, що дало б змогу запропонувати узагальнювальну схему згідно назви дисертаційної роботи.

Ці зауваження не знижують високого наукового рівня та значення представленої роботи. Вважаю, що за актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем, обсягом отриманих даних, теоретичною і практичною значимістю, обґрунтованістю висновків дисертаційна робота «Роль адаптерного протеїну Rsk/CIN85 у рецептор-залежних механізмах активації NADPH-оксидазы і внутрішньоклітинного сигналювання у пухлинних клітинах», відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» відповідної постанови Кабінету Міністрів України, а її автор, Базалій Андрій Вікторович, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біологія.

Офіційний опонент -

доктор біологічних наук,
професор кафедри біохімії
ІНЦ "Інститут біології"
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Матіївська О. П.

Підпис проф. Матіївської завідує -

Заст. директора ІНЦ "Інститут біології"

14 вересня 2016 р.



Курманов О. С.