

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Короткевич Наталії Валеріївни на тему «МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕПАРИН-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНОГО EGF-ПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ ЛЮДИНИ», представлену в спеціалізовану вчену раду Д26.240 01 на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00 04 – біохімія

1 Актуальність теми дисертації. Дослідження ролі факторів росту та їх рецепторів за патологічних станів має суттєве значення для виявлення механізмів, що є основою дисфункції регуляторних процесів в клітинах. Важливими ланками в регуляторних процесах поділу та диференціювання клітин є мітогени родини епідермального фактора росту, які проявляють свою дію на клітини опосередковано рецепторами з тирозинкіназою активністю. До родини цих мітогенів належить гепарин-зв'язувальний фактор росту – HB-EGF, попередник якого є мембрано-заякорений proHB-EGF, який в свою чергу проявляє рецепторну активність по відношенню до дифтерійного токсину. Функціональну активність як ліганд HB-EGF проявляє під впливом позаклітинних протеїназ, за дії яких переходить в розчинну форму – sHB-EGF. Опосередковує свою функцію HB-EGF родинною рецепторів епідермального фактора росту 1 та 4 типів, трансмембранний сигналінг яких може запускатись як гомодимеризацією так і гетеродимеризацією. Існуючі на сьогодні дані щодо ролі HB-EGF –ліганд-рецепторних комплексів в якості транскрипційних факторів і, відповідно, їх транспортування до ядра мають поодинокі не систематизовані відомості. Наразі, за оксидативного стресу та в умовах злоякісної трансформації відмічається ядерна локалізація цих комплексів. Однак, мішені впливу та їх роль залишається не дослідженою. Отже, поставлена автором мета щодо виявлення здатності sHB-EGF людини індукувати ядерну локалізацію EGFR у пухлинних клітинах з надекспресією рецептора є актуальною та обґрунтованою.

Дисертаційна робота виконана в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України в рамках наукових тем «Вивчення структури і функції протеїнів і пептидів для біомедицини», № державної реєстрації 0109U002778, термін виконання теми 2009-2013 р.р., «Використання рекомбінантного рецептора HB-EGF в тест-системах для виявлення дифтерійного токсину та антитоксичних антитіл з протективними властивостями», № державної реєстрації 0111U004316, термін виконання теми 2011 р.; «Структурно-функціональний аналіз протеїнів за норми та деяких патологій», № державної реєстрації 0112U002624, термін виконання теми 2012-2016 р.р.

2. Наукова новизна роботи. Наукова новизна роботи полягає у визначенні нового аспекту в механізмі активації розчинною формою sHB-EGF утворення гетеродимерів та гомодимерів специфічних рецепторів та їх транспортування до ядра і функціонування в якості транскрипційного фактора з тропністю до цикліну D1, конститутивна експресія якого властива для злоякісно трансформованих клітин.

3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження. Дисертаційна робота вирішує актуальну науково-практичну задачу, яка полягає у встановленні здатності розчинної форми гепарин-зв'язувального фактора росту, подібного до епідермального ростового фактору людини – sHB-EGF, стимулювати ядерну локалізацію EGFR у пухлинних клітинах з його надекспресією. Особливістю роботи є системний підхід в дослідженнях із використанням сучасних методичних прийомів з метою комплексного аналізу механізмів внутрішньоклітинного транспортування sHB-EGF/EGFR ліганд-рецепторного комплексу за допомогою одержаного автором рекомбінантного аналогу sHB-EGF людини та його флуоресцентних похідних на основі червоного (mCherry) та зеленого (EGFP) флуоресцентних протеїнів.

Дисертанткою встановлено, що sHB-EGF-стимульоване транспортування EGFR до ядра клітини відбувається ретроградним шляхом з

переважанням активованих лігандом форм рецептора, а також цей активний комплекс може взаємодіяти із промоторною ділянкою гена цикліну D1

Зважаючи на альтернативну активність HB-EGF як рецептора до дифтерійного токсину в результаті виконаної роботи запропонована тест-система для визначення рівня протективних антитіл проти дифтерійного токсину та біологічно активних молекул дифтерійного токсину у біологічних рідинах

4 Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертанткою проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних методичних підходів, а саме цитологічних, цитофлюориметричних, біохімічних, колориметричних, молекулярно-біологічних, методів конфокальної мікроскопії та культури клітин. Отримані результати були проаналізовані за допомогою сучасних статистичних методів обробки даних. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам щодо доказовості наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних.

5 Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, 8 розділів результатів власних досліджень, обговорення результатів, висновків, списку використаної літератури. Робота проілюстрована 40 рисунками та 4 таблицями.

Розділ 1 «Огляд літератури» містить 4 підрозділи, в яких автор надає загальну характеристику HB-EGF людини, розкриває відомі функції цього мітогену, характеризує його рецепторну активність по відношенню до дифтерійного токсину. В огляді літератури наводяться найсучасніші дані щодо ролі HB-EGF в клітинних сигнальних шляхах, про що свідчить список цитованої літератури, переважна кількість яких датована останніми роками.

Автором також аналізується відомості, що мають суперечливий характер щодо здатності розчинної форми HB-EGF проявляти біологічну активність опосередковану EGFR, що стимулює ядерне транспортування останніх у пухлинних клітинах. Провівши детальний аналіз сучасних даних щодо відомих та суперечливих даних про роль HB-EGF в кінці розділу **Огляд літератури** автором сформульовано мету та завдання даної дисертаційної роботи.

Розділ 2. «Матеріали та методи досліджень» складається з 3 підрозділів, а саме Методологія дослідження, Матеріали та Методи дослідження. Останній підрозділ містить 19 пунктів з детальним описом застосованих в дисертаційній роботі найсучасніших методів досліджень, які відображають поставлені метою та завданнями напрями експериментальної роботи. Кількість матеріалу, що досліджувався, його методична обробка, статистичні підрахунки дозволяють вважати висновки роботи достовірними. В даному розділі окремим підрозділом виділено Методологію дослідження. В дисертаційній роботі в результаті порівняльних досліджень для отримання рекомбінантного sHB-EGF людини та його флуоресцентних похідних, було обрано штам *E.coli* Rosetta BL21 (DE3) та бактерійний експресійний вектор *pET-28a(+)*. Зазначена комбінація бактерія-вектор належить до експресійної Системи рЕТ. Запропонований автором підхід надав можливість підвищення продуктивності клітин-продуцентів та збільшення виходу рекомбінантних протеїнів при експресії у бактеріях. Фактично, даний підрозділ можна було б перенести в результати власних досліджень, або ж обговорення, оскільки тут порівнюються різні модельні експресуючі системи для отримання цільового продукту HB-EGF, в результаті чого було відібрано саме вищенаведена систему

Загалом, стосовно розділу матеріали та методи досліджень слід зазначити вражаючий своїм різноманіттям арсенал застосованих методів та концепцій дослідження, які дозволили отримати адекватні та наукоємні результати.

«Результати власних досліджень» складаються з 8 розділів: з яких 3, 4 та 5 розділи присвячені створенню рекомбінантних пептидів HB-EGF та їх фізико-хімічним та молекулярно біологічним характеристикам. Для дослідження рецепторної та регуляторної функцій HB-EGF було створено флуоресцентні похідні трансмембранної та розчинної форм HB-EGF людини, які в подальшому було використано для порівняльної оцінки рівня експресії рецепторів на поверхні різних типів клітин, в тому числі і пухлинних із використанням протокової цитометрії або конфокальної мікроскопії.

В розділі 3 детально наведено послідовність конструювання гену HB-EGF з метою отримання цільового продукту розчинної форми HB-EGF. Однак, виникають певні запитання до цього розділу:

- 1) Для отримання цільового продукту розчинної форми HB-EGF було залучено клітинну лінію 293 (певно це не повна назва HEK293 – лінія ембріональної нирки людини?)
- 2) Рис. 3.3, 3.4 із даного розділу слід було б підписувати наступним чином: електрофореграма за результатами ПЛР аналізу, електрофореграма рестрикційного аналізу плазмідного вектору
- 3) Поясніть термін вищеплення «корової» ДНК?
- 4) Яким чином із клітинної лінії U937 виділяли sHB-EGF і за допомогою якого аналізу підтверджували його чистоту – це був білковий продукт, чи лише матрична РНК.

Розділ 4 присвячену доведенню біологічної активності отриманого рекомбінантного аналогу sHB-EGF людини, основні властивості якої полягають у здатності зв'язуватися з гепарином, проявляти рецепторну активність до дифтерійного токсину та активувати проліферацію клітин опосередковано зв'язуванням із специфічними рецепторами, для чого було використано клітинну лінію 3T3.

Слід зазначити, що зустрічаються деякі неточності в даному розділі. Так, наприклад вказується, що «з використанням МТТ проліферативного тесту, було встановлено здатність отриманого рекомбінантного sHB-EGF

стимулювати ріст та проліферацію клітин лінії ембріональних фібробластів миші 3T3 *in vitro* у концентрації 500 нг/мл», проте на рис.4 7 наведено залежність кількості клітин від терміну інкубації, а не від концентрації внесеного sHB-EGF

В розділах 5 та 6 проведено одержання генетичних конструкцій, що кодують флуоресцентні похідні секреторної та трансмембранної форм HB-EGF та доведено їх біологічну активність в порівнянні з неміченими флуоресцентними аналогами. В даних розділах представлено переконливі результати, які свідчать, що отримані біологічно активні рекомбінантні флуоресцентні похідні трансмембранної та секреторної форм HB-EGF людини проявляють подібну активність та можуть бути використані для внутрішньоклітинних шляхів транспортування HB-EGF

Розділ 7, 8, 9 присвячено дослідженню HB-EGF здатності до ядерного транспортування ліганд-рецепторних комплексів та їх зв'язування з промоторною ділянкою цикліну D1, високий рівень якого є характерним для злоякісно трансформованих клітин. З використанням конфокальної мікроскопії та застосуванням мічених флуоресцентними барвниками HB-EGF доведено колоколізацію цього протеїну в мембрані та ядрі.

Розділ 8 та 9 не зовсім вірно оформлено. Підрозділ 8.1 та 9 1 – висновки до розділів, що не відповідає суті, адже там представлено результати досліджень, а не лише висновки, які не можуть іти пунктами 8.1 та 9 1

Розділ 10 присвячено іншому аспекту функціонування HB-EGF - його рецепції дифтерійного токсину, на основі чого автором пропонується його практичне застосування, а саме розробці тест - системи для визначення в сироватці крові антитіл до дифтерійного токсину В даному розділі представлено тест-систему з детальною розробкою послідовності визначення, наведенням калібрувальних кривих, статистичного та математичного аналізу та наведено методичні рекомендації щодо визначення рівня протективних антитіл до дифтерійного токсину за допомогою HB-EGF

Розділ 11 – аналіз та узагальнення результатів присвячено підтвердженню поліфункціональності молекули HB-EGF, що може надати можливість її подальшого застосування із терапевтичною метою на клітинному та організменному рівнях а саме таких як, стимулювання процесів загоєння ран, опіків, поверхневих виразок різної етіології, стимулювання продукції інсуліну β -клітинами острівків підшлункової залози, а також, для фундаментальних досліджень молекулярних механізмів реалізації біологічної активності HB-EGF

Дисертація завершується підсумком та висновками. Висновки дисертації аргументовані, відповідають меті, задачам та сучасним вимогам до наукових досліджень. Перелік використаних джерел літератури містить 166 найменувань вітчизняних та зарубіжних авторів, із яких 27 викладено кирилицею, 148 – латиницею.

Таким чином, дисертація «Молекулярні механізми реалізації біологічної активності гепарин-зв'язувального EGF-подібного фактору росту людини» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях. Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних тематичних конференціях та з'їздах. Основні положення роботи знайшли своє відображення в наукових фахових виданнях, що відповідають вимогам МОН України, з яких 2 в журналах, що індексуються міжнародною наукометричною базою Scopus.

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної проблеми, на які спирається автор. Основний матеріал дослідження і обґрунтовані наукові результати, які отримані автором, повністю викладені в опублікованих

статтях. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору

Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, що надано у основних розділах дисертації.

7 Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення.

- 1 Слід відзначити певну дискусійність екстраполяції даних, отриманих на моделі пухлинної лінії A431 щодо впливу sHB-EGF на ядерне транспортування EGFR на інші пухлинні клітини через аномально високий рівень експресії рецептора EGFR клітинами A431
2. З методичної точки зору, при проведенні вестерн-блот аналізу, вважаю за необхідне проводити додаткові контролю на наявність забруднення ядерних фракцій фрагментами мембран ендоплазматичного ретикулуму
- 3 Вважаю за необхідне рекомендувати до подальшого дослідження вплив sHB-EGF на ядерне транспортування EGFR у клітинах інших типів пухлин з надекспресією рецептора, а також таких в яких виявлено гормональну дисфункцію (наприклад, рак молочної залози, простати, підшлункової залози та ін..)
- 4 Огляд літератури викладений дещо стисло, хоча і відповідає вимогам до оформлення дисертації.
- 5 В дисертаційній роботі мають місце стилістично невдалі вислови та назначена кількість граматичних помилок.

Проте, слід підкреслити, що відзначені незначні недоліки та поставлені питання не знижують безсумнівного визнання високої науково-теоретичної, фундаментальної і практичної значущості запропонованих науково обґрунтованих результатів представлених в даній дисертаційній роботі, продовження досліджень в напрямках окреслених в даній роботі є перспективними і актуальними і надалі.

8. Відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Короткевич Наталії Валеріївни на тему «Молекулярні механізми реалізації біологічної активності гепарин-зв'язувального EGF-подібного фактору росту

людини», представлена в спеціалізовану вчену раду Д26.240.01 на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія є закінченим науковим дослідженням.

Робота відповідає вимогам пп.11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а здобувач Короткевич Наталія Валеріївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Професор кафедри біохімії
ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету
ім. Тараса Шевченка,
д. б.н., с.н.сп.



Л.В.Гарманчук

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕННИЙ СЕКРЕТАР НДЧ
КАРАУЛЬНА Н.В.
14 04 2014

