

ВІДГУК
офіційного опонента

на дисертаційну роботу ШЕРЕМЕТА Євгенія Юрійовича
"Експресія та просторовий розподіл нейронного кальцієвого сенсорного
білка гіпокальцину в субклітинних компартментах", представлену до
захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Розробка методів визначення внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно-мічених білків є одним із важливих завдань сучасної біофізики. Не менш важливим є з'ясування молекулярних механізмів кальцієвої сигналізації. Цим двом питанням і присвячено дисертаційну роботу Є. Ю. Шеремета, в якій представлено результати досліджень розподілу сенсорного білка гіпокальцину між плазматичною мембраною та цитоплазмою та розробки нового методичного підходу щодо визначення внутрішньоклітинних концентрацій флуоресцентних міток. Зважаючи на широке використання флуоресцентних білків, тематика дисертаційної роботи безперечно є **актуальною** у фундаментальному і у методичному аспектах.

Робота пов'язана з тематикою наукових досліджень відділу молекулярної біофізики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Дисертація, що побудована за загальноприйнятою схемою, містить 109 сторінок основного тексту, список літератури, в якому добре представлені роботи останніх років, і один додаток. Робота добре ілюстрована рисунками і таблицями. Загалом, дисертація добре оформлена, хоча є і деякі недоліки (див. перелік зауважень нижче).

Основні наукові положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 6 публікацій, в тому числі 2 статті у фахових наукових журналах, які входять до наукометричної бази даних Scopus, серед них 1 – у журналі

першого квартилю (Q1). Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд щодо процесів кальцієвої сигналізації і характеристики Ca^{2+} -зв'язувальних білків, серед яких особливу увагу приділено гіпокальцину, є стислим, але надзвичайно змістовним – таким, що демонструє високий рівень теоретичної підготовки автора.

У роботі використано широкий набір сучасних методів біофізики, клітинної та молекулярної біології, описаних у Розділі 2: методи культивування клітин та їхньої трансфекції з метою транз'єнтної експресії, внутрішньоклітинна перфузія, конфокальна мікроскопія, флуоресцентна спектроскопія, відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (FRAP), математичні методи обробки зображень, спектрального аналізу та аналізу даних тощо. Висока якість проведених експериментів та теоретичного аналізу не викликає сумніву.

Робота Є. Ю. Шеремета мала на меті розробити підхід для оцінки внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно-мічених білків, а також визначити концентрацію транз'єнтно експресованого гіпокальцину у клітинах, трансфікованих відповідною плазмідною, та розподіл цього білка між цитоплазмою та плазматичною мембраною. Отримані результати представлені у шести підрозділах розділу 3.

Перші чотири підрозділи викликають особливий інтерес і, на мою думку, являють собою найбільш важливу частину дисертаційної роботи. У першому підрозділі описано розроблений автором новий підхід до вимірювання концентрацій флуоресцентних міток всередині живої клітини. Підхід базується на розрахунку спектральних характеристик конкретної системи реєстрації флуоресценції і двох флуоресцентних міток, концентрація однієї з яких є невідомою, а інша (з відомою

концентрацією) відіграє роль реперу. Після такого розрахунку і вимірювання інтенсивності флуоресценції обох міток, присутніх в одній клітині, оцінка концентрації досліджуваної мітки стає достатньо простим завданням.

У наступному другому підрозділі описано валідацію методу за допомогою двох підходів: вимірювання концентрацій двох різних флуоресцентних міток, які напевно знаходяться у рівному співвідношенні, оскільки приєднані до одного білка, і визначення відомих концентрацій двох флуоресцентних барвників, доставлених у клітину за допомогою петч-клемпу. Автор переконливо показав, що похибка розробленого методу не перевищує 10-30%, і це слід визнати дуже непоганим результатом. У третьому і четвертому підрозділах описано результати застосування розробленого методу для оцінки внутрішньоклітинних концентрацій модельного флуоресцентного білка (а також розподілу цього білка між рухомою та нерухомою фракціями цитозолу) і флуоресцентно-міченого гіпокальцину, що транзійтно експресувався у нейронах гіпокампа.

П'ятий підрозділ розділу 3 присвячено дослідженню дифузії флуоресцентно-міченого гіпокальцину у дендритах нейронів гіпокампа за допомогою техніки FRAP. Порівняння визначених коефіцієнтів дифузії гіпокальцину та реперного мембранного білка вказує, що, при базальному рівні концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} , гіпокальцин знаходиться в основному у цитоплазмі, хоча його частина може бути зв'язана з плазматичною мембраною (а частина мембранного білка може при цьому знаходитись у цитоплазмі).

Певна неоднозначність отриманих результатів, яку детально обговорює автор, змусила його застосувати інший, більш точний підхід

для оцінки розподілу гіпокальцину між цитоплазмою і плазматичною мембраною. Результати представлено в останньому шостому підрозділі розділу 3. На основі ретельного аналізу флуоресцентних зображень, отриманих за допомогою конфокальною мікроскопії клітин з відносно простою геометрією (НЕК 293), показано, що, хоча при базовому рівні внутрішньоклітинного кальцію основна частина гіпокальцину знаходиться у цитозолі, близько 8% цього білка зв'язано із плазматичною мембраною. Цей результат свідчить, що гіпокальцин-опосередковані клітинні процеси можуть бути помірно активовані і у стані спокою.

У Розділі 4, який присвячено аналізу отриманих результатів, автор, обговорюючи їх у загальному контексті даних інших дослідників, пропонує пояснення встановлених закономірностей, оцінює переваги розробленого підходу щодо визначення внутрішньоклітинних концентрацій і окреслює перспективи подальших досліджень.

Підсумовуючи сказане вище, можна стверджувати, що **наукова і практична цінність** дисертаційної роботи Є. Ю. Шеремета полягає в тому, що в ній отримані нові вагомі результати щодо розподілу сенсорного кальцій-зв'язувального білка гіпокальцину між цитозолем і плазматичною мембраною. Крім того – і це, напевно, найбільш важливий результат роботи – розроблено новий метод оцінки концентрацій флуоресцентно-мічених білків всередині живих клітин, який знайде широке застосування у різних галузях клітинної біології. Таким чином, представлені у роботі дані поглиблюють уявлення про молекулярні механізми кальцієвої сигналізації і мають важливе методичне значення. Наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування перш за все в наукових дослідженнях у галузях біофізики, молекулярної і клітинної біології, що проводяться в академічних, освітніх та медичних

установах, які працюють над вивченням механізмів кальцієвої сигналізації та використовують флуоресцентно-мічені білки.

Використання сучасних експериментальних і математичних 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 Є. Ю. Шеремета виникли наступні **зауваження та запитання.**

1. Назва дисертації (а також і сформульована автором мета) не зовсім точно відображає її зміст. По-перше, значна (і, як на мене, більш важлива) частина роботи присвячена розробці методу оцінки внутрішньоклітинних концентрацій флуоресцентних міток. Але це зовсім не відображено ані в назві, ані в сформульованій меті. По-друге, в роботі не вивчалась експресія гіпокальцину – під цим словосполученням (яке не зовсім коректне саме по собі) прийнято розуміти рівень білка, що експресується в клітині з гена, який знаходиться в геномі клітини, а автор вивчав транз'єнтно-експресований ("екзогенний" у термінології автора) білок, ген якого був тимчасово введений в клітину за допомогою плазмідного вектора. Для вивчення внутрішньоклітинного розподілу білка такий підхід цілком адекватний, але він нічого не каже про експресію відповідного гена. Крім того, розподіл білка "в субклітинних

компартментах" практично не вивчався – вивчався розподіл між цитозолем і плазматичною мембраною.

2. Кілька питань викликає представлений у підрозділі 3.1 опис методу визначення концентрацій флуоресцентних міток. Зокрема, хотілося б відсутніх у тексті пояснень щодо фізичного сенсу ефективностей збудження і емісії (коефіцієнтів E_{ex} і E_{em}) та інтегралів у рівняннях 3.2–3.3. Залишилось незрозумілим також, як нормалізувались спектри на рис. 3.2, 3.3 (по площі або по максимуму?) – з тексту, підписів до рисунків і самих рисунків можна зробити різні висновки з цього приводу. Виникає враження, що різні спектри нормалізували по різному – чому? Якій довжині хвилі відповідає коефіцієнт екстинкції у рівн. 3.2 – максимуму спектру збудження? Крім того, зрозуміло, як здійснювалось точкове множення спектрів і оптичних функцій шляхів збудження і емісії, але незрозуміло, як можна "точково множити" оптичні функції на квантові виходи (стор. 60).

3. У підрозділі 2.5 представлено короткий огляд щодо флуоресцентних білків – це було б доречно в огляді літератури, а не в розділі Матеріали та Методи.

4. У тексті роботи зустрічаються невдалі вирази та деякі інші вади оформлення. Наприклад, у преамбулі висновків іде мова про оцінку "біофізичних параметрів" гіпокальцину (а у вступі – про "біофізичні властивості" цього білка). Проте, ніякі біофізичні параметри гіпокальцину в роботі не вивчались, оскільки це і не входило в її завдання (концентрація білка не є його біофізичним параметром або його біофізичною властивістю). У вступі згадуються "генетично кодовані білки", у вступі і висновках – "генетичні методи експресії". До вад оформлення роботи слід віднести недотримання якогось єдиного формату бібліографічного опису джерел у переліку використаної літератури.

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

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Шеремета Євгенія Юрійовича "Експресія та просторовий розподіл нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцину в субклітинних компартментах" 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 висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент,
доктор біологічних наук, професор,
професор ННЦ "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

А. В. Сиволоб

Підпис проф. А. В. Сиволоба засвідчую

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

