

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Гур'янова Дмитра Сергійовича

“Білок BCR як партнер компонентів цитоскелета та везикулярного транспорту при BCR/ABL-позитивній хронічній мієлоїдній лейкемії”, представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03. – молекулярна біологія

Актуальність роботи. Актуальність дисертаційної роботи Дмитра Сергійовича Гур'янова визначається невпинним зростанням кількості хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію, а вискоефективних методів лікування для таких хворих ще немає. Добре відомо, що маркером хронічної мієлоїдної лейкемії є Філадельфійська хромосома, яка є наслідком реципрокної транслокації і утворення гібридного онкогена *Bcr-Abl*. Продуктом цього онкогена є онкопротеїн Bcr-Abl з конститутивною протеїнкіназною активністю. А тому пошук нових підходів до терапії хронічної мієлоїдної лейкемії, направлених на селективне зниження не лише активності, а й рівня онкопротеїну Bcr-Abl, є дійсно актуальним напрямом сучасних наукових досліджень у молекулярній біології, оскільки цей протеїн відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні цього захворювання. Відомо, що порушення цитоскелета може бути причетним до збільшення рухливості лейкемічних клітин та незалежної від цитокінів проліферації. І саме тому дисертаційна робота Дмитра Сергійовича присвячена вивченню можливої ролі протеїну BCR та його PH домену в процесах везикулярного транспорту і реорганізації цитоскелета, які регулюються кортактином та тубуліном, що може мати ключове значення для онкогенної трансформації гемопоетичних клітин, оскільки порушення цих процесів часто зустрічається за онкологічних захворювань.

Загальна характеристика роботи. Дисертаційна робота Дмитра Сергійовича складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел,

який охоплює 201 найменування. Дисертацію викладено на 135 сторінках стандартного машинопису, вона містить 26 рисунків.

В розділі 1 «Огляд літератури» Дмитро Сергійович проаналізував досить велику кількість сучасних літературних наукових даних за темою роботи та обґрунтував необхідність проведення своїх досліджень. Він детально охарактеризувала філадельфійську хромосому (Ph⁺), механізми появи онкогена *Bcr-Abl* та його роль в етіології хронічної мієлоїдної лейкемії, а також протеїнів тубуліну, кортактину і клатрину, причому особлива увага була зосереджена на їх участі в ядрі на термінальній стадії поділу клітин. Автор детально охарактеризував відомі методи визначення білок-білкових взаємодій та внутрішньоклітинної локалізації протеїнів. Проаналізовані також порушення функціонування цитоскелета та везикулярного транспорту за онкогематологічних захворювань.

В розділі «Матеріали і методи» описані сучасні молекулярно-біологічні та інші методи, які були використані ним під час виконання дисертаційної роботи (клонування фрагментів кДНК, трансформація клітин *E.coli*, виділення та очищення плазмідної ДНК, культивування та трансфекція клітин ссавців, фіксація та імунозабарвлення клітин, флуоресцентна конфокальна мікроскопія живих та фіксованих клітин, флуоресцентна мікроскопія надвисокої роздільної здатності STED, біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування, кількісний аналіз співлокалізації протеїнів та статистична обробка результатів).

В розділі «Результати експериментальних досліджень» представлені результати численних експериментальних досліджень, які демонструють співлокалізацію протеїну BCR з кортактином у місцях розгалуження актинових філаментів. Більше того, виявлено потрійну співлокалізацію кортактину, клатрину та BCR, що може свідчити про залучення BCR до Agr2/3-залежного поглинання вкритих клатрином везикул. Автором виявлені також ультраструктурні особливості співлокалізації BCR з актином, клатрином, та кортактином за допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності. Вперше показано, що домен PH протеїну BCR забезпечує його заякорювання до

центросоми, яка є центром регуляції розгалуження актинових філаментів та мікротрубочок. Досліджені структурні особливості точкової співлокалізації між кортактином і BCR в ядрі клітини на термінальній стадії клітинного поділу, що вказує на можливу їх участь у реорганізації ядерного актину для підтримання цілісності архітектури ядра. Дмитро Сергійович також провів біоінформатичний аналіз для виявлення сайтів фосфорилування кортактину кіназою ABL та порівняв їх із сайтами кінази активатора кортактину – SRC. Автором було розроблено алюмінієву камеру для прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії клітин ссавців, що мала переваги над існуючими аналогами.

Варто відмітити, що отримані Дмитром Сергійовичем дані суттєво розширюють розуміння молекулярних механізмів розвитку хронічної мієлоїдної лейкемії і є підґрунтям для розробки альтернативних підходів до її терапії.

У розділі «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» Дмитро Сергійович провів детальний аналіз власних досягнень та порівняв їх із численними даними, опублікованими іншими дослідниками. Все це дало можливість ідентифікувати кортактин як потенційну мішень фосфорилування кіназою Abl, що робить його перспективною мішенню для альтернативних терапевтичних підходів у лікуванні хронічної мієлоїдної лейкемії. Важливим є вивчення ролі домену PH та протеїну BCR у розгалуженні актину, клатрин-опосередкованому ендцитозі та співлокалізації з центросомою, що поглиблює розуміння BCR/ABL в онкогенезі, оскільки порушення реорганізації актину і цілісності центросом корелює з онкогенністю та інвазивністю клітин.

Зроблені Дмитром Сергійовичем висновки є чіткими і повністю відповідають отриманим результатам. Основні наукові положення та висновки дисертаційної роботи знайшли відображення в 8 статтях у фахових журналах та 11 тезах доповідей, зроблених на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях та з'їздах.

Стосовно **наукової новизни одержаних результатів**. Отримані Дмитром Сергійовичем наукові результати є дійсно новими, вони мають вагоме як

наукове, так і практичне значення. Наукова новизна його дисертаційної роботи полягає у виявленні співлокалізації протеїну BCR та домену PH з кортактином і клатрином, зокрема в ядрі клітини на термінальній стадії поділу клітини та в центросомній ділянці, а також показана участь протеїну BCR у розгалуженні актину разом з кортактином, причому отримано зображення комплексу BCR, кортактину і клатрину надвисокої роздільної здатності.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає в ідентифікації кортактину як потенційної мішені фосфорилування кіназою Abl, а це важливо для розробки альтернативних терапевтичних підходів у лікуванні хронічної мієлоїдної лейкемії, а також в'яснення механізмів порушення реорганізації актину і цілісності центросом, що корелює з онкогенністю та інвазивністю клітин. Важливе практичне значення має і розроблена автором камера для прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії клітин.

Поряд з наведеними позитивними сторонами дисертаційної роботи, на мій погляд, доцільно почути думку Дмитра Сергійовича стосовно деяких **дискусійних питань**:

1. З якою вірогідністю можна стверджувати, що співлокалізація онкопротеїну Bcr-Abl з кортактином і клатрином віддзеркалює їх взаємодію?
2. Яка хімічна природа взаємодії онкопротеїну Bcr-Abl з кортактином і клатрином?
3. Які можливі механізми участі онкопротеїну Bcr-Abl у розгалуженні актину і опосередкованому клатрином ендоцитозі?
4. Виявлені вами закономірності мають місце у клітинах з Філадельфійською хромосомою, а що можна сказати про інші пухлинні клітини?

Вищезазначені питання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи, оскільки вони стосуються інтерпретації результатів.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Гур'янова Дмитра Сергійовича "Блок BCR як партнер компонентів

цитоскелета та везикулярного транспорту при BCR/ABL-позитивній хронічній мієлоїдній лейкемії” є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів ця дисертація відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013р., (зі змінами, внесеними згідно Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015р., №1159 від 30.12.2015р. та №567 від 27.07.2016р.), які пред’являються до кандидатських дисертацій, а Дмитро Сергійович заслуговує на присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03. – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,

завідувач відділу молекулярної біології

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

доктор біологічних наук, професор

член-кореспондент НАН України,



Мінченко О.Г.

Підпис *Мінченко О.Г.*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярії
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
*14 04 2021р.

