

ВІДГУК

офіційного опонента – кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Завелевича Михайла Петровича

на дисертацію Гур'янова Дмитра Сергійовича "Блок BCR як партнер компонентів цитоскелета та везикулярного транспорту при BCR/ABL-позитивній хронічній мієлоїдній лейкемії", подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук із спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія

Актуальність теми дослідження

Актуальність теми дисертації не викликає сумнівів, оскільки питання, які піднімаються дисертантом, знаходяться на передньому краї досліджень у сучасній біології та теоретичній медицині. На сьогодні загально визнано, що більшість білків еукаріотів є мультимодульними та поліфункціональними, вони взаємодіють один з одним, утворюючи складні мережі інтеракому. Не є винятком і мережа інтеракомів для білка Bcr-Abl в клітинах ХМЛ. Ідентифікація білків-партнерів та розшифрування механізмів їхньої взаємодії є одним з основних завдань сучасної клітинної біології. Разом із тим це завдання не є простим, оскільки виникають певні складнощі аби відрізнити специфічно взаємодіючі білки, які не є домінуючими за масою у протеомі, від великої кількості білків з великим масовим внеском, що взаємодіють із низькою афінністю. Більше того, взаємодії можуть бути постійними і тимчасовими, можливі і неспецифічні взаємодії. Це може ускладнювати інтерпретацію результатів, отриманих за допомогою класичних методів коїмунопреципітації та афінної преципітації. Тому методи дослідження білок-білкових взаємодій повинні підкріплюватись даними, які б свідчили про фізіологічну релевантність такої взаємодії.

Як відомо, при ХМЛ має місце реципрокна транслокація. Доведеною є безпосередня роль Abl-тирозинкінази у патогенезі цього захворювання, в той час, як на роль Bcr звернули увагу значно пізніше. Не досліджувалась і роль власне PH та DN доменів у трансформації клітин та набутті злоякісних властивостей. А саме наявністю PH та DN доменів і відрізняється p210 від p190. Завдяки доменам PH та DN Bcr може активувати G-білки, що визначає роль Bcr у моделюванні цитоскелету. Через PH домен опосередковується зв'язок з фосфатидилінозитолфосфатами, що сприяє мембранній локалізації Bcr-Abl p210, а це може частково бути фактором, що обумовлює різницю сигнальних шляхів p210 і p190. До того ж домени з гомологією до плекстрину є дуже поширеними і водять до складу близько 300 різних білків, роль яких у регуляції процесів передачі сигналу та інших процесів в клітинах вже є доведеною.

Вивчення ролі доменів Bcr у різних внутрішньоклітинних процесах в нормі та за патології, і зокрема PH домену, безумовно буде сприяти розумінню патогенезу ХМЛ та інших форм лейкемій, до розвитку яких залучені зливні білки Bcr-Abl. А у світлі зазначеного вище особливого значення набуває пошук білків, які в численних мережах можуть взаємодіяти з білком Bcr і зокрема через взаємодію з його PH доменом. В літературі відомі лише поодинокі роботи, в яких аналізується роль Bcr у взаємодії з цитоскелетом (Zheng et al.) через активність Rho-подібних ГТФаз. Показано, що у складі злитого білка ABL/BCR втрачається частина функцій BCR у нормі і разом з тим має місце набуття нових функцій, якими може бути обумовлені ті чи інші патогенетичні особливості ХМЛ.

Відомо, що регуляція перебудов актинового цитоскелету важлива для низки внутрішньоклітинних процесів, зокрема пересуванню клітини, фагоцитозу та внутрішньоклітинних переміщень ліпідних везикул. Автором було поставлено завдання показати можливе місце BCR і домену PH у процесах, що супроводжуються перебудовами

актинового цитоскелету. Це важливий етап дослідження даного питання, який врешті рещт дозволить визначити і функціональну роль BCR і домену PH у цих процесах.

Достовірність та обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної генетики і є логічним продовженням загальної стратегії досліджень відділу, в якій особлива увага приділяється по-перше визначенню ролі Bcr у розвитку онкогематологічних захворювань, і по-друге, пошуку білків-партнерів Bcr з метою розроблення можливої стратегії подолання резистентності, що виникає при застосуванні засобів, які блокують тирозинкіназу активність Abl.

Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 134 сторінках. Вона містить 26 рисунків. Список використаної літератури охоплює 201 найменування.

Метою даної роботи було визначити участь білка BCR та домену PH у розвитку ХМЛ при залученні до процесів везикулярного транспорту та реорганізації цитоскелету.

В огляді літератури наведено загальні відомості про хромосомну транслокацію 9;22, характеристики генів Bcr та Abl та функцій відповідних білків. Дуже вірно зазначено, що на відміну від BCR/ABL, роль ABL/BCR в патогенезі різних форм лейкемії досліджена мало. Окремий фрагмент присвячено домену PH. Вірно зазначено, що домени BCR та ABL у складі химерного білка можуть набувати функцій, що є відмінними від тих, які вони виконують у складі нормальних білків. Оскільки значна частина роботи присвячена взаємозв'язку між Bcr та білками, які мають відношення до функціонування цитоскелету, далі послідовно розглянуті структура та функції тубуліну та кортактину.

Окремий розділ присвячено стислому аналізу методів вивчення білок-білкових взаємодій та внутрішньоклітинної локалізації білків.

Заключний розділ присвячено аналізу нечисленних даних щодо порушень функціонування цитоскелету та везикулярного транспорту при онкогематологічних захворюваннях. Це важливо, оскільки рухливість гемопоетичних клітин є важливою для їхньої функціональності, зокрема вона важлива для взаємодії зі стромальними елементами кісткового мозку та диференціюванням цих клітин, а також для мобілізації дозрілих клітин з кісткового мозку у периферичну кров. Порушення цих процесів внаслідок порушень функціонування цитоскелету може стосуватись певним чином формування злоякісного фенотипу гемопоетичних клітин та клітин-попередників.

В цілому, огляд літератури написано грамотно, як в науковому, так і в літературному аспекті, в ньому висвітлено сучасний стан проблеми, проаналізовано новітні роботи, що стосуються висвітлених питань.

Деякі незначні зауваження до викладеного матеріалу: При порівнянні p210 та p190 зливного білка Bcr-Abl слід все ж мати на увазі, що ХМЛ та ГЛЛ є принципово різними патологіями, в основі яких лежать різні за ступенем диференціювання стовбурові клітини. Тому не можна казати просто про різний ступінь прояву захворювання в залежності від того, яка з форм Bcr-Abl виявляється в злоякісних клітинах. У разі p210 та p190 в патологічний процес залучені різні сигнальні шляхи. Для ХМЛ наявність Bcr-Abl є обов'язковою діагностичною ознакою, для ГЛЛ – лише в частині випадків і не є обов'язковою ознакою. Більше того, відомо, що Abl зливається і з іншими генами внаслідок інших хромосомних транслокацій з утворенням химерних продуктів. В результаті одна й та ж тирозинкіназа асоціюється із зовсім різними захворюваннями. Окрім того, розділ потребує певного

узагальнення, в якому слід проаналізувати загальний стан питання та можливі шляхи його подальшого розвитку.

Розділ "Матеріали і методи". Кінцевим методом дослідження, на основі якого сформульовано висновки роботи – був метод визначення співлокалізації досліджуваних білків. Однак, використано практично всі можливі модифікації цього методу, а саме: дослідження як у фіксованих клітинах, так і прижиттєво; з використанням звичайної конфокальної мікроскопії та мікроскопії високої роздільної здатності, з міченими антитілами проти цільових білків та клітинних структур та з трансфекцією клітин генетичними конструкціями, які окрім досліджуваного білка кодують флуоресцентні білкові мітки. Можна сказати, що з погляду на методичну спрямованість робота є монометодологічною – але поліметодичною – вже не кажучи про всі молекулярно-генетичні методи, а саме конструювання і одержання плазмід, методи роботи з культурами клітин *E coli* та перещеплюваних ліній клітин ссавців. Детально описані метод конфокальної мікроскопії, аналізу та обробки зображень. Більше того, в методичну частину органічно вписується конструювання спеціальної камери для прижиттєвої мікроскопії клітин, що більш детально розглянуто власне у результатах дослідження.

Декілька питань методичного характеру: Яким був часовий проміжок між трансфекцією та детекцією флуоресценції? Чи є повна відповідність реальній ситуації в клітині щодо розподілу певних білків та їхньої співлокалізації в разі застосування методу трансфекції, адже включення мітки до структури білка або надекспресія білків може впливати на внутрішньоклітинне розташування цих білків?

Результати дослідження, викладені в шести окремих підрозділах у відповідності до сформульованих завдань дослідження, написані грамотно, зі знанням справи. Автор вільно володіє термінологією і як із технологічного, так і з лінгвістичного боку опис результатів виглядає досконало.

В роботі було застосовано як генетичні конструкції створені іншими авторами, так і власні конструкції створені автором. Окремий підрозділ присвячено створенню генетичних конструкцій, які б дозволили визначити внутрішньоклітинну локалізацію домену РН білка BCR та повнорозмірного кортактину. Ці генетичні конструкції були злиті з послідовностями відповідних флуоресцентних білків. До речі, досить велика частка в таких конструкціях припадає на флуоресцентні білки – чи може це відбиватись на результатах досліджень зі співлокалізації. І до речі в дослідах з порожніми векторами у автора спостерігався певний відсоток неспецифічної співлокалізації, хоча він і був вірогідно нижчим, аніж у дослідах з цими ж векторами, з'єднаними з досліджуваними послідовностями.

Проведений автором біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилування кіназою Abl тирозинових залишків в складі кортактину є важливим в плані передбачення можливості активації кортактину тирозинкіназою Abl.

Окремий підрозділ присвячено дизайну виготовленої за власними кресленнями автора камери для прижиттєвої конфокальної мікроскопії, яка була застосована в подальших дослідженнях. Зазначено переваги, яких можна досягнути завдяки цій спроектованій та виготовленій конструкції.

За допомогою створених генетичних конструкцій автором перш за все визначено локалізацію РН домену та кортактину - показано у клітинах НЕК293Т, трансфікованих векторами, що містять послідовність домену РН та послідовність повнорозмірного кортактину, РН домен локалізується як в ядрі, так і в цитоплазмі, а кортактин – в цитоплазмі.

При цьому встановлено співлокалізацію РН та кортактину (тобто йдеться про співлокалізацію білків, продукованих трансфікованими генетичними конструкціями).

Виникає також питання, власне домен РН міститься в багатьох сигнальних білках, чи будуть вони також співлокалізуватися з кортактином?

Автор зазначає, що "кортактин за рахунок взаємодії з Arp2/3 комплексом, здатен розгалужувати актин під час поглинання везикул, вкритих клатрином" і, виходячи з цього, ставить питання про взаємодію білка BCR з актином. Оскільки фіксація клітин може порушувати структуру деяких органел та білків, тому важливо було визначити, чи має місце виявлена у фіксованих клітинах співлокалізація у живих клітинах. У наступному фрагменті при прижиттєвому дослідженні клітин продемонстровано потрібну співлокалізацію кортактину, клатрину та повнорозмірного BCR. Автор зазначає динамічну співлокалізацію між BCR та клатрином в живих клітинах HEK293T, трансфікованих відповідними векторами.

Після того, як було визначено, що білок BCR здатен колокалізуватися з кортактином та актином в місцях його розгалуження, а також з клатрином в імовірній ділянці його сортування, важливо визначити, яку роль відіграє в цьому домен РН. Для цього було застосовано мікроскопію надвисокої роздільної здатності. До речі чітко було сформульовано і обґрунтовано необхідність застосування мікроскопії надвисокої роздільної здатності. Виявлено співпадіння результатів з потрібної колокалізації, отриманих за допомогою звичайної конфокальної мікроскопії та мікроскопії надвисокої роздільної здатності. Хотілося б почути додаткове пояснення щодо висновку автора про те, що збільшення частки співлокалізації у зображеннях надвисокої роздільної здатності порівняно з конфокальними говорить про залучення BCR до клатрин-опосередкованого ендоцитозу.

Наступні дослідження були проведені на клітинній лінії ХМЛ K562 з міченими антитілами та фалоїдином, що специфічно зв'язується з актином. Автором було продемонстровано співлокалізацію кортактину та BCR в точках розгалуження актину. Визначено розмір ділянок такої співлокалізації.

Автор робить висновок, що домен РН білка BCR є ключовим для регуляції перебудов цитоскелету за участі кортактину в такому процесі як клатрин-опосередкований ендоцитоз. тобто пов'язуються перебудови цитоскелету та процеси клатрин-опосередкованого ендоцитозу, хоча мені здається на основі самого лише визначення потрібної співлокалізації це може бути лише припущенням, що потребує подальших досліджень. В іншому місці автор справедливо зазначає, що РН домен "залучений" до цих процесів, що більш вірно. Слово "ключовий" в цьому контексті явно поки що передчасне.

Хоча кортактин має переважно цитоплазматичну локалізацію, автором було показано співлокалізацію BCR з часткою кортактину, який виявляється у ядрі. Автор припускає, що така співлокалізація BCR та кортактину в ядрі може бути необхідною для регуляції розгалуження ядерного актину.

В наступному підрозділі розглянуто питання щодо співлокалізації білка BCR з тубуліном. Підкреслено, що це питання в силу певних методичних особливостей принципово могло бути вирішене лише при прижиттєвому дослідженні клітин. Автором показано, що в клітинах HEK293T білок BCR та кортактин співлокалізуються в ділянці центросоми. Потребує роз'яснення фраза "співлокалізація відбувалася в динаміці протягом певного періоду часу (приблизно 80 секунд)".

Обговорення є дуже логічним. В ньому послідовно на основі отриманих власних даних та даних літератури висувається кілька припущень, щодо можливої ролі BCR у клітинах. Автор припускає, що аномальне функціонування кортактину може бути пов'язане з його аномальним фосфорилуванням кіназою Abl, що було припущено на основі біоінформатичного аналізу сайтів фосфорилування кіназою Abl тирозинових залишків в складі кортактину (сподіваюсь, що в подальшому буде експериментально доведено) та колокалізації кортактину з доменом РН. Автор наводить приклади щодо підвищення

інвазивності та метастазування злоякісних клітин внаслідок підвищення експресії кортактину. Хоча невідомо, яким чином ці механізми можуть впливати на злоякісні клітини в разі онкогематологічних захворювань. Тут можна було б згадати про той факт, що аномальне функціонування цитоскелету може відбиватись на адгезії кровотворних клітин-попередників до ендотелію.

Автор зазначає, що вперше було показано, що білок BCR в тандемі з кортактином може брати участь в розгалуженні актинових філаментів, але краще знову таки ж казати – залучений до цих процесів, оскільки немає функціональних доказів. Автор висуває припущення, що структурно така взаємодія відбувається у комплексі Гольджі і що BCR залучений до клатрин-опосередкованого ендоцитозу за участю актину. Детально розглянуто новітні дані літератури щодо ролі актину у клатрин-опосередкованому ендоцитозі. Важливим є визначення колокалізації актину, кортактину, BCR та актину в примембранній ділянці клітин поруч з колокалізацією кортактину, BCR та тубуліну в навколоядерних ділянках. Показано також, що частково клатрин має ядерну локалізацію і проаналізовано значення цього спостереження у зіставленні з даними літератури, зокрема щодо неканонічних функцій клатрину. Виявлена структурна подібність розподілу домену PH та везикул, вкритих клатрином. Все вище зазначене безумовно визначає новизну проведеного дослідження, що є важливим в оцінці дисертаційної роботи.

Заслуговує на увагу, що в обговоренні результатів автор, базуючись на своїх даних у зіставленні з даними літератури, висуває кілька припущень щодо ролі саме химерного білка BCR-ABL, на відміну від BCR з вихідною структурою, в порушенні низки внутрішньоклітинних процесів, які можуть відігравати певну роль у формуванні та прогресуванні злоякісного фенотипу клітин. Зокрема зазначено, що оскільки химерний білок BCR/ABL_{p210} має цитоплазматичне розташування, можна припустити, що це визначається саме ABL частиною, що не дозволяє білку BCR виконувати свої ядерні функції

Новизна та практичне значення одержаних результатів

Аналіз змісту роботи свідчить про те, що проведене дослідження відзначається високим науковим рівнем та безсумнівно містить елементи новизни, що і було винесено автором на захист. Так, одержано нові дані щодо локалізації досліджуваних білків та їхньої взаємодії, що проявляється у виявленні внутрішньоклітинної співлокалізації, доведеної різними методичними підходами. Важливими є дані про співлокалізацію не тільки домену PH, а й повнорозмірного BCR з кортактином та клатрином, а також локалізації BCR в ділянках розгалуження актину.

Проведені дослідження сприяють розумінню механізмів патогенезу онкогематологічних захворювань, асоційованих з білками BCR/ABL, зокрема принципової відмінності лейкемій, асоційованих з різними формами BCR/ABL. Важливими з практичного боку є розроблені автором нові методичні підходи до проведення досліджень, зокрема розробка дизайну камери для прижиттєвої мікроскопії клітин. Отримані автором оригінальні мікрофото за допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності, а також зображення, зроблені в динаміці, можуть бути використані в якості дидактичних матеріалів.

За матеріалами дисертації опубліковано загалом 19 наукових робіт (8 статей та 11 тез), що відображають основний зміст дисертаційної роботи, серед них 5 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України.

Дискусійні положення, зауваження щодо змісту дисертації та запитання до дисертанта

В цілому загальне враження від представленої дисертаційної роботи є позитивним, а зазначені вище зауваження не зменшують високої оцінки дослідження. Деякі неточності щодо презентування матеріалу вже були виправлені при остаточній підготовці рукопису. Робота не тільки завершує певний етап дослідження, а й ставить подальші завдання, які будуть вирішуватись у майбутніх дослідженнях, в чому безумовно також одна з її переваг.

У порядку дискусії хотілось би звернутись до дисертанта з рядом деяких загальних питань, які впливають з даного дисертаційного дослідження. По-перше, цікаво дізнатись думку дисертанта щодо того, наскільки ми наблизились до розуміння ролі BCR у низці внутрішньоклітинних процесів, пов'язаних з процесами на рівні макромолекулярних комплексів, що забезпечують активні процеси внутрішньоклітинного переміщення компонентів і які подальші можливі кроки в цьому напрямі. По-друге, чи є паралелізм у визначенні співлокалізації BCR та PH домену з відповідними білками у клітинах HEK293T та K562, враховуючи, що ці клітини суттєво розрізняються за своїм походженням і функціональним станом.

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертаційна робота Гур'янова Дмитра Сергійовича "Блок BCR як партнер компонентів цитоскелета та везикулярного транспорту при BCR/ABL-позитивній хронічній мієлоїдній лейкемії" є самостійною, цілісною, закінченою науковою працею. Актуальність обраної теми дослідження, обґрунтованість наукових положень та висновків, наукова новизна одержаних результатів, повнота їхнього викладу в опублікованих працях підтверджують, що автор виконав це дослідження на належному високому рівні. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р., (зі змінами, внесеними згідно Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 р. та №567 від 27.07.2016 р.), які пред'являються до кандидатських дисертацій, а Гур'янов Дмитро Сергійович заслуговує на присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Офіційний опонент –

кандидат біологічних наук
старший науковий співробітник відділу онкогематології
Інституту експериментальної
патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України

Завелевич Михайло Петрович



Завелевич М. П.

Воскожицький

М. В.