

ВІДГУК

офіційного опонента – кандидата біологічних наук старшого наукового співробітника відділу функціональної геноміки та прогресії раку Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України Завелевича Михайла Петровича

на дисертацію Кравчука Ігоря Васильовича "Білок-білкові взаємодії PH домену та структурно-функціональні особливості C2 домену білка BCR при Ph' позитивних лейкоміях", 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. Основною метою дисертаційної роботи було дослідження взаємодії PH домену BCR з білками FBNP1, SMC1A, HSPB1 та вивчення структурно-функціональних особливостей C2 домену BCR. Тобто зливний білок BCR-ABL1, нормальний білок BCR та домени цього білка PH та C2 були основними об'єктами дослідження. В назві дисертації зазначено Ph позитивні лейкомії. Ph-позитивність – власне ознака, що зустрічається при різних формах лейкомії, однак тільки у випадку ХМЛ ця ознака є патогномонічною. Робота перш за все стосується структури та функції зазначених білків та відповідних доменів, тому виконана на різних клітинних моделях, зважаючи на те, що білок BCR є доволі консервативним. Хронічний мієлолейкоз є однією з тих патологій, де чітко простежено на молекулярному рівні ланцюг від утворення злитого гена до трансформації стовбурових кровотворних клітин внаслідок нерегульованої надекспресії тирозинкінази. Якщо в багатьох дослідженнях з молекулярних механізмів розвитку та прогресії ХМЛ перш за все основну увагу було приділено ABL1 як онкобілка, з часом стало зрозумілим, що роль BCR в цих процесах є також суттєвою. Тому вивчення структури і функції доменів цього білка та BCR в цілому має не лише фундаментальне значення для розуміння ролі білка BCR у функціонування клітин (і не тільки кровотворних) в нормі, але й дозволяє розширити уявлення про молекулярні механізми лейкозогенезу. А це може стати в пригоді для розробки нових механізмів таргетної терапії ХМЛ та інших онкогематологічних захворювань, тим більше, що пошук нових засобів терапії ХМЛ є на часі, зважаючи на резистентність, яка виникає при застосуванні високо специфічних інгібіторів тирозинкінази BCR-ABL. Активно ведеться пошук не тільки нових інгібіторів тирозинкінази, а й молекул, які взаємодіють із BCR-ABL та відіграють роль у регуляції тирозинкіназної активності.

На сьогодні загально визнано, що більшість білків еукаріотів є мультимодульними та поліфункціональними, вони взаємодіють один з одним, утворюючи складі мережі інтерактому. Не є винятком і мережа інтерактомів для білка BCR- в клітинах ХМЛ та відповідно для білків BCR та ABL в кровотворних клітинах в нормі. Ідентифікація білків-партнерів та розшифрування механізмів їхньої взаємодії є одним з основних завдань сучасної молекулярної 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 зі значним масовим внеском, що взаємодіють із низькою афінністю. Це може ускладнювати інтерпретацію результатів, отриманих за допомогою класичних методів коімунопреципітації та афінної преципітації. Слід також зазначити, що окрім безпосередньої взаємодії між двома конкретними молекулами можливі також взаємодії, які опосередковуються іншими молекулами, коли прямого фізичного контакту і не реєструється. Тому методи дослідження білок-білкових взаємодій повинні підкріплюватись даними, які б свідчили про фізіологічну релевантність такої взаємодії.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Слід зазначити, що науковці відділу впродовж останніх років послідовно розробляють різні аспекти, пов'язані із функціонуванням BCR-ABL та аналізом механізмів його трансформувальної активності. У відділі була започаткована робота по ідентифікації білків-партнерів BCR-ABL та визначенню функції цих білків в клітинах. Представлена робота є логічним продовженням загальної стратегії цих досліджень.

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

Достовірність та обґрунтованість викладених у дисертації наукових положень забезпечена використанням широкого спектру методів дослідження адекватних сформульованій меті та задачам дослідження. Структура дисертаційної роботи логічна, матеріали розділів викладено відповідно до мети і поставлених задач.

Автор дуже чітко сформулював мету та відповідні завдання, спрямовані на досягнення цієї мети. Для виконання поставлених завдань були використані сучасні методи дослідження, полімеразна ланцюгова реакція, клонування фрагментів ДНК для створення генетичних конструкцій, трансформація бактерій, бактеріальна експресія у клітинах *E. coli*, очищення рекомбінантних білків за допомогою афінної хроматографії, культура еукаріотичних клітин, трансфекція еукаріотичних клітин, вестерн-блот аналіз, пулдаун аналіз, *far*-вестерн-блот аналіз, коімунопреципітація, біоінформатичний аналіз, імунофлуоресцентний аналіз, флуоресцентна і конфокальна мікроскопія.

Дисертаційну роботу викладено на 146 сторінках стандартного машинопису, вона містить 27 рисунків, 2 таблиці та 1 додаток У списку використаних літературних джерел 213 посилання.

В першому розділі подано ґрунтовний огляд літератури з питань, що стосуються теми дисертації. Окремо розглянуто структуру білків ABL1 та BCR та їх функції в нормі і патології. Зазначається, що окрім ХМЛ, ABL1 пов'язаний з рядом форм лейкемій, в яких відбувається його злиття з іншими генами. Наведено дані літератури, які свідчать про те, що хоча ABL1 є протоонкогеном, нормальний ABL1 може виконувати роль супресора пухлинного росту. Розглянуто доменні структури нормальних BCR та ABL1, а також різних варіантів BCR-ABL1 Після чого розглянуто структуру гібридного гена BCR-ABL1 з різними варіантами перебудов. Оскільки дисертація присвячена взаємодії PH домену BCR з білками FNBP1 (формін-зв'язувальний білок 1), SMC1A, білком теплового шоку HSPB1, детально

розглядається і структура та функції цих білків. Ці питання детально пророблені і заслуговують на самостійні оглядові роботи. За виключенням деяких неточностей у термінології, в огляді літератури практично немає суттєвих недоліків, хіба що розділ не завершується узагальненням щодо можливості розробки нової стратегії та пошуку відповідних молекулярних мішеней. Також, на мій погляд, бракує окремого підрозділу, присвяченого проблемам аналізу структурних та функціональних міжбілкових взаємодій в цілому, де б зазначалось, які переваги та недоліки численних методів, що застосовуються в таких дослідженнях.

В другому розділі описано методи дослідження, застосовані при виконанні даної роботи. Методи описано детально із зазначенням всіх реагентів та приладів. Зазначено також велику кількість конструктів, одержаних від зарубіжних колег. Детально описані технології роботи з плазмідами, а також технології роботи з рекомбінантними білками. Перераховано з відповідними посиланнями на ресурси біоінформатичні методи, які в роботі посідають чільне місце. В розділі є лише незначні упущення. Зокрема, не зазначено, яким чином підбирали послідовності для праймерів, немає опису *far-western*-блот аналізу. Також, на мій погляд, матеріал щодо принципів та розрахунків даних, одержаних методом конфокальної мікроскопії можна було б більш розширено подати у розділі "Матеріали та методи", оскільки цей метод є загальним щодо двох досліджуваних білків. Можна було б стисло подати і методіку, за допомогою якої досліджували фагоцитоз в клітинах.

Розділ 3 присвячено викладенню основних експериментальних даних дисертаційного дослідження. Спочатку детально описано моделювання вторинної та третинної структури C2 домену білка BCR за допомогою біоінформатичних методів та порівняно результати, одержані на базі різних платформ для цього домену. Виходячи з результатів біоінформатичного аналізу, було створено вектор для експресії C2 домену та отримано і очищено білок, що являє собою C2 домен білка BCR. Вивчено властивості отриманого білка, зокрема його взаємодію з низкою фосфоліпідів.

В наступних підрозділах розглянуто взаємодію білка FNBP1 з PH доменом білка BCR. Для цих досліджень використані клітини 293T, трансфіковані відповідними конструктами. Для виконання досліджень було створено генетичну конструкцію для бактеріальної експресії повнорозмірного FNBP1. Білкова взаємодія була доведена за допомогою преципітації з імобілізованим на сефарозі білком. Ці дані були уточнені шляхом аналізу взаємодії між N-кінцевим фрагментом FNBP1 та PH доменом білка BCR, для чого було сконструйовано послідовність, яка дозволила одержати N-кінцевий фрагмент FNBP1 та застосовано метод *far*-блотингу, який дозволив виявити цю специфічну взаємодію. І нарешті, за допомогою імунофлуоресцентного аналізу з подальшою конфокальною мікроскопією було показано безпосередньо колокалізацію між білками FNBP1 та BCR. Ці дослідження проведені на культурі мишачих макрофагоподібних клітин J774, а колокалізація відповідних білків була продемонстрована в процесі фагоцитозу, що дало змогу припустити можливу участь білка BCR у цьому процесі. Може цікаво було б подивитись і на картинку відсутності такої взаємодії, коли фагоцитоз не відбувається? В цілому слід зазначити, що застосування в комплексі різноманітних підходів до аналізу міжбілкових взаємодій, кожен з яких має свої

переваги та недоліки, дозволяє припустити, що взаємодія між BCR та FNBP1 є скоріше за все специфічною, що відкриває перспективи подальших розробок у цьому напрямі.

Колокалізацію білків BCR та SMC1A досліджено виключно методом імунофлуоресцентного аналізу з конфокальною мікроскопією. І ці дослідження проведені саме в клітинах K562, які є клітинами ХМЛ. Колокалізація цих білків в клітинах була доведена, але бажано було б дати більш розгорнуті пояснення результатів. Слід зазначити, що результати визначення колокалізації проілюстровані якісними мікрофото, а рівень колокалізації коректно оцінений за допомогою прийнятих статистичних методів.

В наступному підрозділі наводяться дані досліджень, результатом яких було створення генетичної конструкції рЕТ-42-HSPB1 та її експресія з одержанням рекомбінантного повнорозмірного білка HSPB1. Автор зазначає, що в подальшому можливо дослідження взаємодії між HSPB1 та BCR. Але навряд чи доцільно називати весь підрозділ «Перші етапи вивчення взаємодії між HSPB1 та BCR», можна обмежитись лише заголовком «Створення генетичної конструкції рЕТ-42-HSPB1», тим більше, що саме створення кількох генетичних конструкцій заявлено як одне із завдань дисертації.

Окремий фрагмент досліджень, інформація про який міститься серед різних підрозділів, присвячений біоінформатичному пошуку сайтів фосфорилювання білків FNBP1, SMC1A та HSPB1 для оцінки можливої ролі кіназної активності BCR-ABL1 у їх регуляції. Наведено також результати експериментальних досліджень зв'язування C2 домену BCR з фосфоліпідами (в принципі, воно реальне, а не потенційне, як зазначається у завданнях дослідження).

Цікавим є окремий розділ стосовно можливого застосування CRISPR технології, спрямованої на точку розриву хромосомної транслокації. Хоча цей матеріал подано лише в загальних рисах, це не зменшує значення таких досліджень і їх майбутнього спрямування.

В цілому розділ власних досліджень викладено досить якісно, хоча трапляються деякі термінологічні та стилістичні огріхи, які можна виправити, що однак аж ніяк не зменшує загального позитивного враження від цього матеріалу.

Зазначу деякі, як на мій погляд, переваги викладення матеріалу власних досліджень. По-перше, автор намагається складні речі донести дуже доступними для розуміння спеціалістам широкого профілю. А головне – автор добре розуміє, що кожен з експериментів має свої обмеження і не приховує цього, окреслюючи коло пов'язаних питань.

В кінці кожного підрозділу наведено перелік публікацій, в яких висвітлені результати відповідних досліджень. Незначним недоліком є, мабуть, тільки відсутність коротких підсумкових речень в кінці кожного підрозділу, які б узагальнювали б одержані результати.

В розділі 4 дисертант узагальнює та аналізує одержані результати. Послідовно викладено стислі результати відповідних розділів дослідження у зіставленні з даними літературних джерел. Зазначено теоретичне та можливе практичне значення досліджень структури та функції C2 та PH доменів білка BCR. Найважливішою частиною роботи, як зазначає автор, було отримання рекомбінантного C2 домену, який і став моделлю, що дозволила дослідити його структурно-функціональні властивості, і зокрема низку білок-білкових взаємодій. Власні результати порівнюються с інформацією, наведеною в

публікаціях інших авторів. Поставлені проблеми, які було б доречно досліджувати в подальших дослідженнях, зокрема щодо аналізу колокалізації досліджених в роботі білків на різних стадіях поділу клітини. Принципових зауважень до розділу обговорення немає.

Висновки чітко сформульовані і відповідають поставленим в дисертації завданням.

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, вперше було отримано рекомбінантний С2 домен білка BCR. Одержано нові дані щодо можливих білків-партнерів BCR. Продемонстровано взаємодію білка FNBP1 з PH доменом білка B, підтверджену імунофлуоресцентним аналізом з конфокальною мікроскопією. Продемонстровано колокалізацію білка SMC1A з білком BCR в клітинах ХМЛ. Робота здебільшого має теоретичне значення, але накопичені дані щодо взаємодії досліджених білків з BCR безсумнівно стануть у пригоді для розробки таргетних препаратів майбутніх поколінь. Одержані дані можуть бути включені до відповідних баз даних щодо особливостей функціонування сигнальних каскадів в лейкемічних клітинах.

За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових публікацій, з них 11 статей у фахових журналах та 9 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових конференцій, з'їздів та конгресів. Публікації відображають основний зміст дисертаційної роботи.

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 обговорити деякі загальні питання, які впливають як з даного дисертаційного дослідження, так і із загально біологічних міркувань щодо проблем, які підняті у цій роботі.

Чому для дослідження взаємодії з BCR були обрані білки FNBP1 та SMC1A? Чи це був попередній біоінформатичний аналіз чи якісь інші міркування?

Чи всі взаємодії, виявлені щодо рекомбінантного С2 домену білка BCR, будуть дійсними для білка BCR в цілому? Чи може змінитись конфігурація або доступність сайтів домену, коли ми будемо розглядати їх у складі цілісного білка?

Чому взаємодію PH домену білка BCR з білком FNBP1 та його N-кінцевим фрагментом досліджували різними методами? Чи це було пов'язано з певними методичними особливостями?

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертаційна робота Кравчука Ігоря Васильовича "Білок-білкові взаємодії РН домену та структурно-функціональні особливості С2 домену білка BCR при Ph' позитивних лейкоміях" 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 Кравчука Ігор Васильович 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 функціональної геноміки і прогресії раку
Інституту експериментальної
патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України

Завелевич Михайло Петрович

