

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 Антоненко Світлани Василівни "Роль USP1, GLG1, ZNF217 у розвитку Bcr-ABL-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії", подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук із спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика

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.

Роботу виконано на моделі клітин ХМЛ К562. Слід зазначити, що саме ХМЛ це одна з тих патологій, де чітко простежено на молекулярному рівні ланцюг від утворення злитого гена до трансформації стовбурових кровотворних клітин внаслідок надекспресії нерегульованої тирозинкінази. Застосування високо специфічного інгібітору тирозинкінази Bcr-Abl являє собою принципово новий підхід у терапії злоякісних новоутворень, коли за мету ставиться не знищення малігнізованих клітин цитостатиками, які є надзвичайно токсичними для нормальних клітин організму, а інгібування активності надекспресованого та нерегульованого ферменту, що перешкоджає поділу злоякісних клітин та сприяє стабілізації процесу, хоча і без знищення першоджерела злоякісності. Такий підхід досяг максимальної ефективності саме у випадку ХМЛ, хоча із змінним успіхом інтенсивно ведуться спроби застосувати його і для інших злоякісних новоутворень. Ведеться пошук не тільки нових інгібіторів тирозинкінази, а й молекул, які взаємодіють із Bcr-Abl та відіграють роль у регуляції тирозинкіназної активності. Такі молекули, в свою чергу, можуть бути кандидатами на мішені відповідних терапевтичних впливів.

На сьогодні загально визнано, що більшість білків еукаріотів є мультитмодульними та полі функціональними, вони взаємодіють один з одним, утворюючи складні мережі інтерактому. Не є винятком і мережа інтерактомів 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. 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.

Однією з важливих регуляторних посттрансляційних систем у клітинах є система убіквітинуювання-деубіквітинуювання. Убіквітинуювання за лізином за частотою не поступається фосфорилуванню білків. Хоча однією з основних функцій убіквітинуювання є протеолітична деградація білків у протеосомах та лізосомах, є й багато інших регуляторних функцій, зокрема координація внутрішньоклітинної локалізації білків, активування та інактивування активності білків, модулювання білок-білкових взаємодій. Один по суті біохімічний процес – приєднання залишків убіквітину – забезпечується великою кількістю ферментів різної специфічності. І, відповідно, зворотний процес деубіквітинуювання теж забезпечується великою кількістю деубіквітиназ, в тому числі і з родини USP. Регуляція багатьох кіназ, включаючи рецепторні тирозинкінази, опосередковується деубіквітиназами, Аналіз взаємодій білка Bcr-Abl в клітинах ХМЛ з однією з найбільш поширених деубіквітиназ, USP1 та

можливих наслідків такої взаємодії в плані регулювання активності Bcr-Abl складає основний зміст дисертаційної роботи С.В. Антоненко.

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 активно розробляють різні аспекти, пов'язані із функціонуванням Bcr-Abl та аналізом механізмів його трансформувальної активності. Представлена робота є логічним продовженням загальної стратегії цих досліджень. За попередньо отриманими результатами мас-спектрометричного аналізу проведеного у відділі молекулярної генетики ІМБГ НАН України, саме білок USP1 був визначений як потенційний кандидат у партнери із взаємодії із онкобілком Bcr-Abl. Представлена ж робота присвячена експериментальному підтвердженню такої взаємодії і, що особливо, аналізу можливих її функціональних наслідків.

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, а також застосуванням адекватних методів статистичного аналізу. Структура дисертаційної роботи логічна, матеріали розділів викладено відповідно до мети і поставлених задач.

Метою дослідження було визначення взаємодій онкобілка Bcr-Abl із білками USP1, GLG1, ZFP217. Автор дуже чітко сформулювала мету та відповідні завдання, спрямовані на досягнення цієї мети. Для виконання поставлених завдань були використані сучасні методи дослідження, зокрема ПЛР, створення плазмідних конструкцій, коїмунопреципітація, афінна преципітація, вестерн-блот, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія. Використані також методи біоінформатики.

Дисертаційну роботу викладено на 158 стор., проілюстровано 41 рисунком (мікрофото та діаграми), містить 2 таблиці. У списку використаних літературних джерел 203 посилання.

В першому розділі подано ґрунтовний огляд літератури з питань, що стосуються теми дисертації. Детально розглянуті молекулярно-генетичні механізми розвитку ХМЛ та дії інгібіторів тирозинкінази Bcr-Abl, а також розвитку резистентності до цих інгібіторів у процесі їхнього застосування для лікування хворих на ХМЛ. Вочевидь, незважаючи на високу та тривалу ефективність застосування іматинібу, поява все нових мутацій Bcr-Abl призводить до того, що у змаганні між новими мутаціями Bcr-Abl та новими інгібіторами практично не видно переможця. Дисертант справедливо зазначає, що багато інших стратегій впливу та Bcr-Abl не виявились ефективними через відносно невисоку специфічність такого впливу і переходить до опису білка USP1, взаємодія якого із Bcr-Abl і є основним предметом викладених у дисертаційній роботі досліджень. Розглянуті також і існуючі на сьогодні сполуки, що є інгібіторами USP1. Особливо цікавими є факти підвищення експресії USP1 в злоякісних клітинах різного походження та дані літератури, які свідчать про можливість використання цього білка як потенційної терапевтичної мішені. Оскільки окрім взаємодії з USP1 в роботі розглянуто взаємодії Bcr-Abl з глікопротеїном комплексу Гольджи GLG1 та білком з мотивом цинкового пальця ZFP217, в огляді літератури стисло подані також відомості про два цих білки. (Краще все-таки казати не білок цинкового пальця а білок, що містить відповідний домен або мотив). 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.

В другому розділі описано методи дослідження, застосовані при виконанні даної роботи. Методи описано детально із зазначенням всіх реагентів та приладів. Зокрема, детально описані технології роботи з плазмідами. В розділі є лише незначні упущення. Зокрема, не зазначено концентрацію клітин при проведенні імунофлуоресцентного аналізу, помилково термін конfluентність вживається стосовно суспензійної культури, не зазначено, як готували розчин інгібітору USP1, не деталізовано методику коімунопреципітації в разі застосування антитіл проти фосфотирозину.

Розділ 3 присвячено викладенню основних експериментальних даних дисертаційного дослідження. перш за все слід зазначити, що у р.3.1 завдання вірно сформульовано методологічно – як виявлення фізичної взаємодії між білками, партнерство яких вже припускається. Хоча слід зазначити, що окрім безпосередньої взаємодії методично можливо також виявлення взаємодій, які опосередковуються третіми молекулами. Дисертант показала, що для клітин K562 характерна наявність всіх трьох ізоформ білка USP1, в той час як із онкобілком Vcr-Abl взаємодіють лише дві із них. У роботі було застосовано метод імунофлуоресцентного аналізу, який виконували у суспензії клітин без їхнього прикріплення до поверхні субстрату, що було сформульовано як одне із завдань дослідження. Такий підхід безсумнівно є цінним методичним моментом дисертації. Щодо опису досліджень з колокалізації білків, слід зазначити, що матеріал щодо коефіцієнтів кореляції Пірсона та колокалізації Мандерса можна було б подати у розділі Матеріали і методи, а самі коефіцієнти навести у вигляді таблиці із статистичним аналізом, що було б більш наглядним, аніж це зроблено в розповідній текстовій формі, як це, до речі, зроблено у відповідній публікації автора в *Experimental Oncology*.

Шляхом імунофлуоресцентного аналізу вперше показано ядерну колокалізацію онкобілка Vcr-Abl і білка USP1 у клітинах ХМЛ. Після експериментального підтвердження прямої фізико-хімічної взаємодії кінази Vcr-Abl з білком USP1, автор перевірила наявність фосфорильованих за тирозином форм білка USP1 у клітинах K562. Експериментальне вивчення фосфорильованого білка USP1 здійснили за допомогою методу коімунопреципітації та імунофлуоресцентного аналізу клітин K562. При цьому найбільше фосфорильовані саме ті дві ізоформи USP1, які взаємодіють із онкобілком Vcr-Abl. припускаємо, що саме взаємодія з кіназою Vcr-Abl може спричиняти появу фосфорильованого USP1 у клітинах K562 (хоча це до певної міри опосередковане припущення). У цьому розділі не зовсім чітко прописані методичні деталі, а саме, чи взаємодія з антитілами проти фосфотирозину виявлялась вже після преципітації білків з антитілами проти USP1. Те ж саме стосується результатів аналізу імунофлуоресцентним методом, оскільки антитіла проти фосфотирозину можуть виявляти і виявляють різні білки, фосфорильовані за тирозином. По правді кажучи, автор наводить і пояснює відповідні значення коефіцієнтів взаємного перекриття, аналізуючи одержані картини конфокальної мікроскопії. Факт колокалізації є переконливо доведеним. Але все ж хотілося б почути методичні роз'яснення щодо можливості кількісного аналізу колокалізації у разі, коли інтенсивність флуоресценції двох барвників дуже різниться через різний вміст відповідних мішеней.

За допомогою методу копреципітації та рекомбінантних білків, які продукуються в клітинах, трансфікованих відповідними плазмідними векторами, а також при застосуванні афінного осадження було визначено його взаємодію саме з доменом PH. Причому в разі застосування генетичних конструктів було показано, що PH домен зв'язується з усіма трьома ізоформами білка USP1, в той час як із повнорозмірним білком Vcr-Abl взаємодіють лише дві із них. Автор наводить можливі пояснення такого феномену.

На завершення всіх досліджень із структурної взаємодії автором було проведено функціональні дослідження за допомогою специфічного інгібітору USP1. Інгібування ферментативної активності USP1 призводило до суттєвих змін його внутрішньоклітинної

локалізації та зниженням колокалізації з Bcr-Abl. Більше того, інгібування деубіквітинування призводило до оборотного зниження рівня тирозинкінази. В цьому плані мабуть цікаво було б дослідити рівні тирозинкінази у клітинах за багаторазового додавання інгібітору.

В цілому слід зазначити, що застосування в комплексі різноманітних підходів до аналізу між білкових взаємодій, кожен з яких має свої переваги та недоліки, дозволяє припустити, що взаємодія між Bcr-Abl та USP1 є скоріше за все специфічною, що відкриває перспективи подальших розробок у цьому напрямі.

Дисертантом було розширено коло можливих білків-партнерів Bcr-Abl, зокрема вивчали взаємодію з GLG1, ZNF217. Дослідження були побудовані за тим же планом, хоча і без деталізації, як у випадку USP1. Висновком проведених досліджень стало підтвердження взаємодії Bcr-Abl з GLG1 із колокалізацією цих білків у комплексі Гольджі та фосфорилуванням за тирозином білка GLG1, а також взаємодії з ZNF217. Фактично вперше продемонстровано структурний зв'язок Bcr-Abl з одним з компонентів комплексу Гольджі. Але в цих фрагментах дослідження основним результатом стала демонстрація та підтвердження взаємодії. Разом з тим проведені і певні функціональні дослідження. Так, було показано, що іматиніб суттєво знижує експресію білка ZNF217 в клітинах K562.

В розділі 4 дисертант узагальнює та аналізує одержані результати. Автор порушує проблему різних стратегій впливів на Bcr-Abl – як вже існуючої з інгібуванням тирозинкіназної активності, так і гіпотетичних, пов'язаних із вибірковою деградацією тирозинкінази. В цьому розділі послідовно викладено стислі результати відповідних розділів дослідження у зіставленні з даними літературних джерел. Принципових зауважень до розділу обговорення немає, хіба що бракує узагальнення щодо можливого використання різних стратегій впливу на онкобілки (мабуть не тільки щодо ХМЛ), хоча цей матеріал наводиться в огляді літератури. Зокрема, автор наводить дані літератури про те, що транскрипційний фактор – інгібітор ДНК зв'язування Id1 є суттєвим для неконтрольованої проліферації клітин різних типів лейкоїдів. USP1 за рахунок деубіквітинування рятує цей інгібітор від протеасомної деградації. Важливо при цьому, що Id1 є спільною мішенню для різних протеїназ BCR-ABL, TEL-ABL FLT3-ITD, що є злитих білків при різних типах лейкоїдів, які виникають внаслідок специфічних хромосомних транслокацій. А це ще один можливий тип стратегії із використанням специфічного впливу на USP1.

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, одержано нові дані щодо партнерів Bcr-Abl в клітинах ХМЛ. Проаналізовано не тільки структурну міжбілкову взаємодію, а й взаємозалежний вплив між змінами активності відповідних ферментів та рівнями експресії та змінами внутрішньоклітинної локалізації партнерів, що свідчить про певні функціональні залежності. Безсумнівно одержані дані можуть бути включені до відповідних баз даних щодо порушення функціонування сигнальних каскадів в лейкоїдних клітинах. Робота здебільшого має теоретичне значення, але накопичені дані щодо взаємодії USP1 з Bcr-Abl безсумнівно стануть у пригоді в разі практичної розробки таргетних препаратів майбутніх поколінь.

За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових робіт, що відображають основний зміст дисертаційної роботи, серед них 8 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України.

Дискусійні положення, зауваження щодо змісту дисертації та запитання до дисертанта

Зазначу, що в цілому загальне враження від представленої дисертаційної роботи є позитивним, а зазначені вище зауваження не зменшують високої оцінки дослідження. Деякі неточності щодо презентування матеріалу були зазначені вище і частково 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.

Так, зокрема автор припускає можливість розроблення нових стратегій лікування ХМЛ, а може й інших онкологічних патологій, які ґрунтуються на можливому застосування інгібіторів таких поширених у клітинах білків як USP1. Однак, відомо, що USP1 має широкий спектр клітинних субстратів. Які міркування автора з цього приводу, чи може призвести таке (можливо відносно неспецифічне) інгібування до порушення балансу функціонування убіквітинуючих і деубіквітинуючих білків у злоякісних клітинах? Якими, з іншого боку, можуть бути наслідки зниження фосфорилування USP1?

Загальний висновок та оцінка дисертації

Дисертаційна робота Антоненко Світлани Василівни «Роль USP1, GLG1, ZNF217 у розвитку та прогресуванні у Vcr-Abl-позитивної хронічної мієлоїдної 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 виконала 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 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 Світлана Василівна Антоненко заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22. – молекулярна генетика.

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.

І.М. Воробей