

ВІДГУК**офіційного опонента**

на дисертаційну роботу Ігоря КРАВЧУКА

“Білок-білкові взаємодії РН домену та структурно-функціональні особливості С2 домену білка BCR при Ph⁺-позитивних лейкоміях“

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03. - молекулярна біологія

Актуальність обраної роботи.

Дисертаційна робота Ігоря КРАВЧУКА присвячена вивченню молекулярних основ патогенезу хронічної мієлоїдної лейкомії (ХМЛ), яка є однією з найпоширеніших різновидів лейкомії, що є актуальним, оскільки кількість цих захворювань невідомо зростає, а ефективного лікування досягти не вдається, незважаючи на значні успіхи в лікуванні ХМЛ. Виявляється ще багато випадків, які не піддаються сучасним методам терапії, що можливо пов'язано з високою нестабільністю геному, яка зменшує ефективність терапії. Тобто проблеми лікування даного захворювання не є остаточно подоланими та залишаються актуальними. При вивченні патогенезу хронічної мієлоїдної лейкомії основна увага приділялася дослідженню *ABL1* у гібридному гені *BCR-ABL1*, а *BCR* частина цього злитого гена залишалася не дослідженою. Саме тому дослідженню *BCR* частини гібридного гена *BCR-ABL1*, його ролі у патогенезі хронічної мієлоїдної лейкомії і присвячена дисертаційна робота Ігоря КРАВЧУКА.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем: «Роль Bcr-асоційованих білків у сигнальних шляхах при мієлопроліферативних захворюваннях» (номер державної реєстрації – 0108U008527, 2009-2013 рр.), «Роль різних форм білка Bcr-ABL1 в сигнальних шляхах та формування пухлинного фенотипу при мієлопроліферативних неоплазмах» (номер державної реєстрації – 0113U004305, 2014-2018 рр.), «Ендогенні чинники розвитку мієлопроліферативних пухлин та раку передміхурової залози» (номер державної реєстрації – 0119U100821, 2019-2023 рр.), «Особливості експресії генів, що обумовлюють розвиток та формування хіміорезистентності в мієлоїдних новоутвореннях» (номер державної реєстрації – 0123U102367, 2024-2028 рр.).

Оцінка обґрунтованості наукових результатів і висновків, сформульованих у дисертаційній роботі.

Матеріали дисертаційної роботи викладено згідно поставленої мети та завдань дослідження. У дисертаційній роботі детально проаналізовано сучасну наукову літературу щодо патогенезу ХМЛ. Для досягнення поставленої мети була використана велика кількість як класичних, так і новітніх методів молекулярної та клітинної біології. Отримані результати, як і зроблені на основі них висновки є обґрунтованими та переконливими. Основні положення, висновки та практичні рекомендації дисертації Ігоря Кравчука логічно витікають із отриманих ним експериментальних результатів і є добре обґрунтованими.

Наукова новизна представлених результатів, повнота викладення в опублікованих працях

Отримані автором результати характеризуються новизною і повністю відображені в опублікованих працях. Так, вперше було отримано рекомбінантний С2 домен білка BCR і методом кругового дихроїзму була підтверджена його вторинна структура, що дозволило встановити взаємодію С2 домену цього білка з різними фосфоліпідами. На основі цих даних можна зрозуміти локалізацію та можливе функціонування обумовлене специфічністю такої білок-ліпідної взаємодії. Вперше показано взаємодію білка FNBP1 з PH доменом білка BCR шляхом коімунопреципітації і підтверджена участь N-кінцевої ділянки FNBP1 у взаємодії з PH доменом. Виявлена також колокалізація SMC1A з BCR. Автором створені генетичні конструкції для бактеріальної експресії білка HSPB1 та системи CRISPR-Cas9 спрямованої на місце розриву при хромосомній транслокації. Результати цієї роботи вказують на досі невідомі зв'язки BCR-ABL1 з цілим рядом клітинних процесів і відкривають нові перспективні напрямки досліджень.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових робіт, із них 11 статей у фахових журналах (3 з яких входять до Q4) та 9 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових конференцій, з'їздів та конгресів.

Достовірність основних наукових положень, висновків та одержаних результатів

Достовірність одержаних результатів, основних наукових положень і висновків не викликає ніяких сумнівів, оскільки дослідження часто проводились різними методами, збільшуючи їх загальний рівень інформативності та достовірності.

Теоретичне та практичне значення результатів дисертаційного дослідження

Результати досліджень у представленій роботі, мають високе теоретичне та практичне значення. Представлене дослідження розкриває нові дані стосовно молекулярних основ патогенезу хронічної мієлоїдної лейкемії, що сприяє кращому розумінню молекулярних механізмів патогенезу Ph⁺-позитивних лейкемій, пояснює вплив BCR частини гібридного BCR-ABL1 на цей процес.

Вивчені автором структурно-функціональні особливості C2 домену дозволяють розкрити особливості роботи білка BCR, а його взаємодія з фосфоліпідами вказує на можливі місця його локалізації. Встановлена взаємодія PH домену з білком FNBP1, а також колокалізація BCR з FNBP1 та SMC1A дають прямий вихід на клітинні процеси, на які можуть залучатись BCR та BCR-ABL1. Практичне значення одержаних результатів полягає у розкритті нових клітинних процесів, в які залучені як нормальний BCR, так гібридні BCR-ABL1, через взаємодію з PH та C2 доменами. Створені векторні конструкції, що можуть бути використані для наступних досліджень у цій області. Створено CRISPR-Cas систему спрямовану проти хромосомних транслокацій, що потенційно може послужити для розробки нових терапевтичних підходів не тільки для Ph⁺-позитивних лейкемій, а і для інших патологій з аномальними хромосомними перебудовами.

Структура дисертації. Оцінка змісту дисертаційної роботи, мови, стилю.

Дисертаційна робота Ігоря КРАВЧУКА викладена українською мовою на 142 сторінках друкованого тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків і списку використаних джерел, який оплює 213 найменувань. Робота містить 27 рисунків, 2 таблиці та 1 додаток. Більшість досліджень виконано дисертантом особисто.

У вступі викладено дані про актуальність роботи, мету дослідження, завдання, об'єкт та предмет дослідження, методи, наукову новизну, практичне значення отриманих результатів, особистий внесок здобувача, дані про апробацію результатів дисертації, публікації, структуру та обсяг дисертації.

Огляд літератури складається із п'яти підрозділів. Детально проаналізована велика кількість наявних на даний момент наукових даних за темою дисертації, які обґрунтовують необхідність виконання цієї роботи. У розділі «Матеріали та методи дослідження» детально описані використані автором сучасні методи молекулярної біології та біохімії: полімеразна

ланцюгова реакція, клонування фрагментів ДНК для створення генетичних конструкцій, трансформація бактерій, бактеріальна експресія протеїнів, очищення рекомбінантних білків за допомогою афінної хроматографії, трансфекція еукаріотичних клітин, електрофорез білків у поліакриламідному гелі, вестерн-блот аналіз, пулдаун аналіз, far-вестерн-блот аналіз, коімунопреципітація, біоінформатичний аналіз структури білка, метод кругового дихроїзму, біоінформатичний аналіз даних секвенування наступного покоління, імунофлуоресцентний аналіз, флуоресцентна і конфокальна мікроскопія, кількісний аналіз зображень тощо. У наступному розділі автор представляє результати досліджень по створенню різних генетичних конструкцій, біоінформатичних аналізів, результатів взаємодій з білками та фосфоліпідами, результати мікроскопічних досліджень колокалізацій, які є добре обґрунтованими та підтримуються даними статистичного аналізу. Рисунки, наведені у цьому розділі, змістовні, а підписи до них чіткі. Варто відмітити, що отримані Ігорем КРАВЧУКОМ результати детально проаналізовані. Висновки є конкретними, сформульовані чітко і повністю відображають результати всіх основних досліджень.

Список використаних джерел містить велику кількість посилань на сучасні статті у вітчизняних і міжнародних виданнях.

Таким чином, дисертація Ігоря КРАВЧУКА викладена у науковому стилі, грамотною мовою, відповідає діючим вимогам, що пред'являються до дисертаційних робіт та є завершеною науковою працею, результати якої значно доповнюють наші знання щодо функціонування гібридного гена *BCR-ABL1* і ролі доменів BCR у патогенезі ХМЛ. Отримані результати можуть бути основою сучасної ад'ювантної терапії цього захворювання.

Недоліки дисертаційної роботи щодо їх змісту та оформлення.

Дисертаційна робота Ігоря КРАВЧУКА містить всю необхідну для дисертації інформацію, написана і оформлена належним чином. Принципових недоліків в роботі не виявлено, а поодинокі граматичні помилки істотно не впливають на високу оцінку роботи.

Проте є декілька питань, що носять переважно дискусійний характер.

1. Як Ви вважаєте, чи можливо повністю вилікувати хворого на ХМЛ і від чого це залежить?

2. Які сучасні тенденції лікування Ph⁺-позитивних лейкемій?

3. В чому перспектива роботи з системою CRISPR-Cas9 у боротьбі з ХМЛ?

4. Які перспективи розвитку цієї актуальної теми?.

Висновок:

Дисертаційна робота Ігоря КРАВЧУКА “Білок-білкові взаємодії РН домену та структурно-функціональні особливості С2 домену білка BCR при Ph⁺-позитивних лейкеміях“ є завершеною науковою працею, за своєю актуальністю, науково-теоретичним рівнем, науковою новизною і практичним значенням повністю 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 Постанови 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 її автор Ігор КРАВЧУК заслуговує присудження йому наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

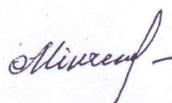
Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,

член-кор. НАН України,

завідувач відділу молекулярної біології Інституту біохімії

ім. О. В. Палладіна НАН України,



Олександр МІНЧЕНКО

