

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Усенко Марії Олександрівни «Створення генно-інженерних кон'югатів і їх використання для виявлення та очищення важливих у терапевтичному значенні білків», подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність. Рекombінантні злиті протеїни, в яких поєднуються властивості протеїну-партнера та маркерної молекули (афінної або ензимної мітки), мають широкі перспективи для використання в сучасних медико-діагностичних дослідженнях. За їх допомогою можна створювати імуноафінні сорбенти, їх можна використовувати як імунологічні зонди, вони є перспективними для застосування у імунодіагностиці. Тому робота Усенко М.О., присвячена оптимізації методів отримання функціонально активних генно-інженерних кон'югатів на основі протеїнів-партнерів та маркерних молекул, становить значний науковий і практичний інтерес і є актуальною.

Зв'язок з науковими темами установи, де виконано дисертацію. Роботу виконано у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Дослідження проводилось у рамках тем: «Отримання генно-інженерних імунокон'югатів і їх застосування для імуноафінної хроматографії та виявлення цільових антигенів», державна реєстрація № 0115U005022, 2015-2019 рр; «Вивчення біологічних особливостей альтернативних станів МСК желе Вартона пуповини людини», державна реєстрація № 0117U3913, 2018-2022 рр. **Практичне значення** одержаних результатів полягає в оптимізації методів отримання препаративної кількості рекombінантних злитих протеїнів rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut в системі синтезу *E. coli*. Для кожного з зазначених протеїнів оптимізовано метод його ренатурації із бактерійних тілець включення. На основі rhIL7-His та rhIL7-CBD створено хроматографічні

сорбенти, які використано для отримання високоспецифічних поліклональних антитіл. Застосування rhIL7-BAPmut забезпечило проведення ефективного скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів для отримання scFv(IL-7) з високими показниками афінності та специфічності. Отримані протеїни можуть бути перспективними кандидатами для виявлення розчинної форми рецептора sIL7R α , рівень якого потребує моніторингу при багатьох патологічних станах організму. Отримано імунокон'югат scFv(IFN β 1b)-BAPmut і показано його ефективність для швидкого виявлення концентрацій інтерферона бета-1b людини в діагностичних дослідженнях. Розроблено схему отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини в активній формі з метою подальшого пошуку її ефективних інгібіторів. Запропоновані методичні підходи можна запроваджувати у технологію виробництва рекомбінантних протеїнів, подібних за структурою та функціональними особливостями до описаних у роботі.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у розробці ефективних методів отримання функціонально-активних рекомбінантних протеїнів rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-BAPmut, scFv(IFN β 1b)-BAPmut та ASK1. Вперше продемонстровано можливість використання rhIL7-His та rhIL7-CBD для створення імуноафінних сорбентів, розроблені сорбенти застосовано для виділення специфічних до IL-7 антитіл з сироваток імунізованих тварин із чистотою понад 95%. Отриманий вперше злитий білок rhIL7-BAPmut застосовано для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. Вперше отримано злитий білок scFv(IFN β 1b)-BAPmut, який дозволяє виявляти інтерферон бета людини в діагностичних дослідженнях.

Структура дисертації. Роботу побудовано за класичною схемою. Вона містить вступ, чотири розділи, висновки, перелік використаних джерел, що містить 152 найменування, додаток. Повний обсяг дисертації становить 137 сторінок друкованого тексту, містить 30 рисунків та 6 таблиць.

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертації, вказано зв'язок роботи з науковими програмами, визначено мету, завдання, об'єкт і предмет досліджень, методи дослідження, вказано наукову новизну й практичне значення одержаних результатів, наведено дані щодо апробації та публікацій.

В огляді літератури, викладеному на 22 сторінках, наведено матеріал щодо структури і функцій обраних об'єктів дослідження, цитокінів hIL-7, інтерферона β -1b та протеїнкінази ASK1. Детальний аналіз їх ролі у патогенезі, розвитку та перебігу аутоімунних захворювань, дозволив авторці визначити напрямки та основні завдання дисертаційної роботи.

Використані у роботі сучасні методи досліджень детально описано у другому розділі: ПЛР, виділення та рестрикційний аналіз ДНК, конструювання плазмідних векторів, гель-електрофорез, хроматографічне очищення та ренатурація протеїнів, ензимний імуносорбентний аналіз ELISA, Вестерн-блот, визначення активності hIL-7 на культурі клітин та інші.

В третьому розділі представлено основні експериментальні результати, отримані авторкою. У системі синтезу *E. coli* отримано рекомбінантні злиті протеїни rhIL7-His та rhIL7-CBD, розроблено методи їх ренатурації. Встановлено активність отриманого протеїну rhIL7-His у тесті на мононуклеарних клітинах периферичної крові. Серед іншого показано, що найбільш ефективним методом ренатурації виявився метод діалізу. Активність ренатурованого rhIL7-CBD було підтверджено за результатами зв'язування із специфічними антитілами в ELISA. Отримані протеїни, після іммобілізації на відповідних матрицях, було застосовано як біоафінні сорбенти високої ємності для виділення у препаративній кількості високоочищених специфічних до IL-7 поліклональних антитіл із сироваток імунізованих тварин. Специфічність отриманих антитіл було підтверджено методом Вестерн-блот аналізу та в ELISA. Отримано злитий протеїн rhIL7-VARmut та встановлено оптимальні умови його ренатурації. Проведено скринінг імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів

імуноглобулінів миші із використанням rhIL7-BAPmut, що продемонструвало можливість одностадійного виявлення специфічних до IL7 антитіл. Також в роботі описано отримання rhIL7 з нативним N-кінцем в системі синтезу *E. coli*, за допомогою створеного рекомбінантного протеїну CBD-intein(his)-IL7. Встановлено оптимальні умови його синтезу та підібрано умови протеїнового сплайсингу. За допомогою методів дот-блот та імуноензимного аналізу продемонстровано функціональну активність та високу специфічність отриманих злитих антитіл scFv(IFN β 1b)-BAPmut до IFN β -1b людини, які можуть бути застосовані для одностадійного виявлення цього цитокіну. Розроблено метод отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 у функціонально активній формі, показано ефективність її використання для пошуку специфічних інгібіторів цієї кінази. Також досліджено персоналізовану відповідь мононуклеарних клітин периферичної крові на обробку різними концентраціями IL-7 з використанням двоетапної схеми стимуляції МНПК. Такий тест може бути прогностичним для оцінки стану імунної системи людини.

В заключному розділі авторкою обговорено і систематизовано великий обсяг отриманого фактичного матеріалу, узагальнено наведену інформацію, проаналізовано переваги отриманих генно-інженерних кон'югатів в контексті різноманітних способів їхнього практичного застосування.

Наведені **висновки** відповідають меті та завданням, поставленим авторкою. Перелік використаних джерел літератури містить 152 посилання українською та англійською мовами.

Наостанок слід зазначити, що в дисертаційному дослідженні ретельно виконано великий обсяг експериментальної роботи. Проведення таких досліджень свідчить про кваліфікацію дисертантки і високий науковий рівень роботи в цілому. Достовірність отриманих в роботі результатів і обґрунтованість положень дисертації забезпечуються широким спектром використаних авторкою надійних сучасних експериментальних методів.

Таким чином, дисертація Усенко Марії Олександрівни «Створення генно-інженерних кон'югатів і їх використання для виявлення та очищення важливих у терапевтичному значенні білків» є завершеною науковою роботою. Основні положення та висновки дисертації повністю викладені в авторефераті.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та в авторефераті. Основні теоретичні положення і висновки дослідження Усенко М.О. повною мірою відображено в 15 публікаціях, серед яких: 5 статей, з них 4 опубліковані у фахових наукових виданнях України, 1 у зарубіжному виданні, 1 патент на корисну модель, 9 тез наукових доповідей. Автореферат повністю відображає сутність і результати дисертаційного дослідження. Дисертаційна робота та автореферат оформлені належним чином і відповідають вимогам державних стандартів і МОН України. *Матеріал дисертації викладено ясно і послідовно, ретельно оформлено, ілюстрації виконано на належному рівні.*

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення. Разом з тим, до змісту і до стилю викладення дисертаційної роботи є деякі зауваження, а саме:

1. Бажано уніфікувати у тексті дисертації терміни, а саме використовувати «ензим, протеїн» або «білок, фермент».
2. На мою думку недостатню увагу в роботі приділено пошуку низькомолекулярних інгібіторів ASK1 з використанням методів комп'ютерного моделювання.
3. Запропонований для ренатурації метод діалізу виявився найефективнішим, однак він є не достатньо технологічним та може унеможливити масштабування процесів напрацювання протеїнових препаратів.
4. Розділ «Узагальнення» потребує додаткового узагальнення, адже дисертантка не просто виконала поставлені завдання, але і сформувала алгоритм робіт, необхідних для оптимально

ефективної продукції рекомбінантних протеїнів, імуносорбентів на їхній основі та виділення антитіл до цих протеїнів. Такий алгоритм може мати вагоме прикладне значення у подальших роботах у цьому напрямку.

Утім, вищевказані окремі зауваження не впливають на загальну високу оцінку наукового рівня рецензованої дисертації.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Усенко Марії Олександрівни «Створення генно-інженерних кон'югатів і їх використання для виявлення та очищення важливих у терапевтичному значенні білків» є цілісною завершеною науковою працею. За актуальністю, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, логічністю і обґрунтованістю висновків дисертація відповідає вимогам, встановленим у пп. 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 року (зі змінами, внесеними згідно з постановами Кабінету Міністрів № 656 від 19 серпня 2015 року, № 1159 від 30 грудня 2015 року, № 567 від 27 липня 2016 року, №943 від 20 листопада 2019 року), які пред'являються до кандидатських дисертацій, а її авторка заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент:

завідувач відділу структури і функції білка

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

кандидат біологічних наук


В.О. Чернишенко

Підпис *В.О. Чернишенко*
Засвідчую
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
20 р.

