

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

1. **Актуальність теми дисертації.** Дисертаційна робота Усенко М.О. присвячена вирішенню актуальної наукової проблеми, пов'язаної з розробкою ефективних методів отримання рекомбінантних біфункціональних білків, які можна широко застосовувати в сучасних фундаментальних і прикладних медико-діагностичних дослідженнях. Такі дослідження передбачають застосування високоспецифічних антитіл з високим ступенем чистоти. Одним з ефективних методів їх отримання в препаративній кількості є афінне очищення антитіл на антигені, який закріплюється на сорбенті через послідовність білка-партнера або афінної мітки. Також, сучасним методом є отримання одноланцюгових антитіл - scFv. Такі молекули менші за розмірами і легко піддаються генно-інженерним маніпуляціям. Необхідним етапом їх отримання є селекція комбінаторних бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів *in vitro*. Отже, створення кон'югатів на основі цільового антигену для проведення відбору високоспецифічних та високоафінних scFv є актуальним. Використання химерних молекул як імунологічних зондів значно здешевлює проведення імунологічних досліджень порівняно з використанням комерційно доступних моноклональних антитіл, хімічно кон'югованих з ферментом. Це дозволяє говорити про їх перспективність для застосування як у класичних типах імунодіагностики, так і в нових напрямках досліджень молекулярних процесів *in vivo* та *in vitro*.

Одним з маркерним цитокінів вірусних та аутоімунних захворювань є інтерлейкін-7 людини (hIL-7), визначення рівня якого має прогностичне значення для оцінки цих патологій. В перебігу і терапії такого аутоімунного захворювання як розсіяний склероз важливу роль також відіграє рекомбінантний інтерферон IFN β -1b. Актуальним є швидкий моніторинг його концентрації, який можна проводити із застосуванням злитого з ферментною міткою scFv(IFN β 1b). Однією з протеїнкіназ, що залучена до розвитку розсіяного склерозу, є протеїнкіназа ASK1. Актуальним є отримання її рекомбінантного аналога для розробки нових інгібіторів ASK1 людини, які можуть бути використані для дослідження ролі цієї протеїнкінази в патогенезі аутоімунних захворювань і, як далекоглядна перспектива, в комплексній терапії цих патологічних станів. Саме тому, в дисертаційній роботі Усенко М.О. поставлено за мету створення біфункціональних генно-інженерних кон'югатів на основі цільових білків та маркерних молекул, визначення можливості їх практичного застосування для виявлення та очищення специфічних антитіл, перевірка ефективності отриманих злитих білків для проведення імунологічних досліджень.

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «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.

2. **Наукова новизна роботи** полягає у розробці ефективних методів отримання функціонально-активних рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-BApmut, scFv(IFN β 1b)-BApmut та ASK1. Продемонстровано можливість використання rhIL7-His та rhIL7-CBD для створення імуноафінних сорбентів. Із білком rhIL7-CBD вперше створено

хроматографічний сорбент за принципом орієнтованої іммобілізації rhIL-7 через CBD на целюлозі. Сорбент на основі rhIL7-His розроблено з використанням Ni-NTA агарози як носія. Розроблені сорбенти застосовано для виділення специфічних до IL-7 антитіл з сироваток імунізованих тварин із чистотою понад 95%. Отриманий вперше злитий білок rhIL7-ВАРmut застосовано для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. Вперше отримано злитий білок scFv(IFN β 1b)-ВАРmut, який дозволяє виявляти інтерферон бета людини в діагностичних дослідженнях.

3. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Оптимізовано методи отримання препаративної кількості рекомбінантних злитих білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-ВАРmut в системі синтезу *E. coli*. Для кожного з зазначених білків 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-ВАРmut забезпечило проведення ефективного скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів для отримання scFv(IL-7) з високими показниками афінності та специфічності. Отримані білки 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)-ВАРmut 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 білків, подібних за структурою та функціональними особливостями до описаних у роботі.

4. Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертанткою проведено експериментальне дослідження з використанням сучасних мікробіологічних, генно-інженерних, молекулярно-біологічних, імунохімічних, біохімічних, біоінформаційних методів. Отримані результати проаналізовано за допомогою сучасних статистичних методів обробки даних. Використані методи дослідження повністю відповідають меті, завданням дисертації та сучасним вимогам для підтвердження наукових досліджень. Отриманий матеріал базується на фактичних даних, що відповідають первинній документації і забезпечують вірогідність отриманих даних, зроблені висновки відображають поставлені завдання дисертаційної роботи.

5. Оцінка змісту дисертації, її завершеності в цілому та ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації. Дисертацію побудовано за традиційним планом. Вона складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу експериментальних досліджень, аналізу й узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. На початку роботи наведено перелік використаних позначень та скорочень. Текст із переліком літератури (152 джерела), ілюстраціями (30 рисунків) та таблицями (6) викладено українською мовою на 137 сторінках комп'ютерного тексту.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; наведено мету і задачі дослідження; дано визначення об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації; публікації, а також про структуру та обсяг дисертації.

В стислому змістовному **розділі 1 «Огляд літератури»**, що складається з 6 підрозділів, розглянуто дані про структуру і функції hIL-7 і його рецептора, сигнальні шляхи IL-7, висвітлено проблеми використання інтерферона- β у лікуванні розсіяного склерозу, увагу приділено

функціональній характеристиці кінази ASK1 в контексті розвитку патологій, у тому числі при аутоімунних захворюваннях. Розділ демонструє достатній рівень теоретичної підготовки автора.

Стосовно літературного огляду можна зазначити деякі недоліки, а саме:

- при використанні схем, таблиць та рисунків інших авторів доцільно вказувати прізвище автора/рів а лише потім посилання цифрове;
- зазвичай, в кінці розділу **Огляд літератури** варто наголосити щодо спірних питань, які пов'язані з об'єктами та предметом Вашого дослідження, висвітлити взаємозв'язок між досліджуваними цільовими білками та наголосити на актуальності власних досліджень, поставлених в меті та завданнях дисертаційної роботи.

В розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» дисертантом наведено широкий спектр використаних в роботі сучасних молекулярно-біологічних та біотехнологічних методів (трансформація, нарощування і культивування бактерій, ПЛР, виділення, рестрикційний аналіз та конструювання плазмідної ДНК, електрофорез ДНК, експресія рекомбінантних білків, ферментний імуносорбентний аналіз ELISA, імуноблотинг, хроматографічне очищення білків, електрофорез білків).

При аналізі даного розділу виявлено деякі недоліки та виникли зауваження:

- при первинному введенні скороченої назви МНПК не міститься повна розшифровка клітин, їх походження, умови отримання та культивування;
- для кращого сприйняття застосованого переліку методів дослідження варто їх було б об'єднати, наприклад молекулярно-біологічні, електрофоретичні, хроматографічні, тощо.

Незважаючи на незначні недоліки даний розділ за спектром використаних методів та експериментальних схем вражає найсучаснішими підходами біотехнологічних досліджень.

Розділ 3. «Результати експериментальних досліджень» складається із **восьми підрозділів**. В підрозділі **3.1** наведено результати щодо оптимізації бактеріальної експресії трьох рекомбінантних злитих білків на основі rhIL7 з афінними та ферментними мітками, а саме rhIL7-His, rhIL7-CBD та rhIL7-VAPmut у системі *E. coli*. Проаналізовано особливості CBD та VAPmut компонентів білків, обраного плазмідного вектора та умов індукції цільових білків.

В підрозділі **3.2**, присвяченому отриманню функціонально активного рекомбінантного білка rhIL7-His, було проведено порівняльний аналіз різних варіантів ренатурації білка з бактерійних тілець включення. Описано перевірку активності rhIL-7, ренатурованого різними методами, із застосуванням тесту на мононуклеарних клітинах периферичної крові. Встановлено найбільш ефективний метод ренатурації, яким виявився метод діалізу.

В підрозділі **3.3** викладено результати щодо оптимізації умов очищення та ренатурації отриманого рекомбінантного rhIL7-CBD. Приділено увагу методу отримання біоафінного сорбенту високої ємності шляхом іммобілізації rhIL7-CBD на мікрокристалічній целюлозі. Висвітлено процес виділення специфічних до IL-7 поліклональних антитіла із сироваток імунізованих тварин, який дозволяє одержувати антитіла високого ступеня чистоти у препаративній кількості.

В підрозділі **3.4** визначено оптимальні умови функціонування VAPmut та встановлено оптимальні умови ренатурації отриманого злитого білка rhIL7-VAPmut. Показано, що rhIL7-VAPmut можна застосовувати для скринінгу імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів миші шляхом аналізу реплік бактерійних колоній. Зазначено, що rhIL7-VAPmut також може бути використаний для одностадійного виявлення специфічних до IL7 антитіл, що дозволяє суттєво скоротити час проведення імуноферментного аналізу та зменшити витрати на імунореагенти.

В підрозділі 3.5. продемонстровано результати отримання rhIL7 з нативним N-кінцем в системі синтезу *E. coli*, за допомогою створеного рекомбінантного білка CBD-intein(his)-IL7, в якому N-кінець rhIL7 білка був злитий з Mxe GyrA інтеїном. Встановлено оптимальні умови його синтезу та підібрано умови білкового сплайсингу.

У підрозділі 3.6 описано результати експресії отриманих продуцентів scFv(IFN β 1b)-VAPmut. За допомогою методів дот-блот та імуоферментного аналізу продемонстровано функціональну активність та високу специфічність до IFN β -1b людини отриманих злитих антитіл.

Підрозділі 3.7 присвячено отриманню рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1. Описано встановлені автором умови, що забезпечують синтез білка в бактерійній системі *E. coli* в препаративних кількостях у функціонально активній формі. Приділено увагу перевірці ензиматичної активності отриманої протеїнкінази ASK1, та встановлено діапазон оптимальних концентрацій рекомбінантної протеїнкінази ASK1 для дослідження інгібувальної активності сполук при пошуку її низькомолекулярних інгібіторів.

В підрозділі 3.8 наведено результати аналізу реакції МНПК на IL-7, що дозволило оцінити *in vitro* персоналізовану відповідь МНПК на збільшення концентрації rhIL-7 та міжіндивідуальну мінливість реакцій клітин у здорових людей. Описано розроблені модифікації стандартного біологічного аналізу IL-7, приділено увагу двоетапній схемі стимуляції МНПК, вказано встановлений діапазон концентрацій IL-7, оптимальний для побудови кривих залежності відповіді клітин. На основі отриманих результатів було припущено, що екзогенний IL-7 підтримує регуляцію апоптозу частини T-клітин, активованих 5-денним культивуванням з ФГА, і що ті самі клітини можуть бути більш чутливими до низьких концентрацій IL-7.

- Незважаючи на повноту та різнобічність представлених результатів варто було б порівняти ефективність застосування rhIL7-VAPmut для одностадійного виявлення специфічних до IL7 антитіл при

проведенні імуноферментного аналізу з класичними двостадійними методами і наголосити на ефективності даного біотехнологічного підходу в імунодіагностиці найпоширеніших патологій.

- Чи порівнювали Ви чутливість Ваших методів при виявленні цільових антигенів з існуючими тест-системами?
- І знову ж таки, варто було б більш детально пояснити, чому, власне, для двох, на перший погляд, розрізнених цільових антигенів Ви проводили отримання антитіл?

У розділі 4 автором проведено узагальнення отриманих результатів. Проаналізовано варіативність відповіді мононуклеарних клітин периферичної крові (МНПК) на обробку препаратом rhIL-7, охарактеризовано виявлену міжіндивідуальну мінливість відповідей МНПК на rhIL-7. Автором узагальнено інформацію про ефективність обраних методів ренатурації отриманих функціонально активних білків. Проаналізовано переваги використання сорбентів, отриманих на основі білків rhIL7-CBD та rhIL7-His.

Оскільки робота біотехнологічна, бажано було б надати у розділі 4 узагальнюючу схему отримання зазначених генно-інженерних біокон'югатів.

Наведені висновки відповідають меті та завданням, поставленим автором. Перелік використаних джерел літератури містить 152 посилання українською та англійською мовами, 60 з яких опубліковані в останні 10 років.

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.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях.

Автором проведено висвітлення матеріалів роботи на вітчизняних та міжнародних з'їздах, конференціях та школах. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано в 15 наукових працях, в тому числі в 5

статтях у фахових наукових журналах, з яких 2 статті – в журналах, що входять до наукометричної бази Scopus, 1 патенті на корисну модель, 9 тезах доповідей у матеріалах наукових конференцій, в тому числі, міжнародних.

При рецензуванні опублікованих статей встановлено, що вони мають необхідні елементи в своїй структурі і містять постановку загальної проблеми та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями, аналіз останніх досліджень, в яких започатковано розв'язання даної проблеми, на які спирається автор. Інтерпретація отриманих даних, основні положення, що виносяться на захист, та висновки належать автору. Всі публікації повністю відображають результати та суть дослідження, які надано у основних розділах дисертації.

7. Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення. За позитивної оцінки, проведеної автором роботи можна відзначити наявність деяких загальних недоліків дисертації, таких як присутність в тексті дисертації окремих орфографічних помилок, опісок, невдалих перекладів з англійської мови.

Незначну кількість недоліків та запитань було прокоментовано при аналізі розділів дисертаційної роботи, тому не вважаю за доцільне зупинятись на цих питаннях та зауваженнях повторно.

Таким чином, в результаті проведеного аналізу дисертаційної роботи Усенко Марії Олександрівни «Створення генно-інженерних кон'югатів і їх використання для виявлення та очищення важливих у терапевтичному значенні білків», встановлено, що дисертація є завершеним актуальним самостійним дослідженням, виконаним на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та відповідністю висновків поставленим завданням. За обсягом і рівнем виконаних досліджень, їх викладенням, отриманими практичними результатами, оформленням дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки. Автореферат дисертації достатньо повно та адекватно висвітлює її зміст.

8. Відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Усенко Марії Олександрівни на тему «Створення генно-інженерних кон'югатів і їх використання для виявлення та очищення важливих у терапевтичному значенні білків» представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія є закінченим науковим дослідженням. Робота відповідає вимогам пп. 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а здобувач Усенко Марія Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 – біотехнологія.

Професор кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
д.б.н., проф.

Л.В.Гарманчук

