

04 ГРУ 2015

Вх. №

37/03-07/1/К/15

## Відгук

офіційного опонента на дисертаційну роботу ЛАБИНЦЕВА Андрія Юрійовича «**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ РЕЦЕПТОР-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНОЇ ТА ТРАНСПОРТНОЇ ФУНКЦІЇ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ**», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Сучасний етап розвитку біохімії характеризується поглибленим вивченням структури білків, їх комплексів та молекулярних механізмів регуляції функціональної активності білків. Особливо важливим є вивчення механізмів функціонування білків при різних захворюваннях. Вивчення структурної організації токсичних білків та їх комплексів дозволяє виявити молекулярні основи їх функціонування та створити передумови для спрямованого дизайну нових лікарських препаратів. Дисертаційна робота ЛАБИНЦЕВА Андрія Юрійовича присвячена встановленню молекулярних механізмів реалізації рецептор-зв'язувальної та транспортувальної функцій дифтерійного токсину. Тема дисертаційної роботи, безумовно, є актуальною і відповідає сучасним тенденціям розвитку біохімії і молекулярної біології.

Метою роботи було вирішення таких завдань як одержання та характеристика рекомбінатних модельних протеїнів, необхідних для дослідження рецептор-зв'язувальної та транспортувальної функції дифтерійного токсину, дослідження особливостей взаємодії фрагментів дифтерійного токсину з клітинами чутливих та нечутливих до токсину видів тварин, встановлення особливостей цитотоксичної дії субодиниці В дифтерійного токсину та вивчення можливості впливу Т-домену дифтерійного токсину на внутрішньоклітинний транспорт.

Для виконання поставлених завдань застосовано комплекс сучасних методів, таких як гель-електрофорез для розділення протеїнів та ДНК, метало-афінна хроматографія для очистки протеїнів, визначення кінетичних параметрів взаємодій ліганд-рецептор, кількісне вираження співлокалізації протеїнів, визначення рН всередині ендосом за конфокальними зображеннями, отримання рекомбінантних протеїнів, отримання

рекомбінантних ДНК, отримання стабільних клонів-продуцентів цільових протеїнів, оптичні методи, протокова цитометрія, конфокальна мікроскопія, ковалентне мічення протеїнів флуоресцентними мітками та методи роботи з культурами клітин еукаріот.

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини, що включає опис матеріалів і методів дослідження, викладення результатів дослідження та їх обговорення, висновків, списку літератури, що містить 158 джерел, та додатків. Загальний обсяг дисертації становить 140 сторінок.

У вступі дисертантом сформульовані актуальність теми, мета та завдання дослідження, наукова новизна, теоретичне та практичне значення роботи.

В огляді літератури проведено узагальнення сучасних уявлень про структуру дифтерійного токсину та його рецептора, механізмів взаємодії дифтерійного токсину з мембраною, його неканонічні функції. У цілому огляд написано кваліфіковано та надає уяву про сучасний стан досліджуваної проблеми. Наявність в огляді літератури ілюстративного матеріалу значно покращує сприйняття тексту.

У розділах 3,4, 5, 6 та 7 наведені результати власних досліджень та їх узагальнення.

### **Найбільш суттєві результати, які одержані дисертантом**

Отримано та охарактеризовано рекомбінантні модельні протеїни, необхідні для дослідження рецептор-зв'язувальної та транспортувальної функцій дифтерійного токсину: mCh-SubB, mCh-Rd, EGFP-Rd, mNect-SubB, mNect-Rd, pH-SubB та pH-Rd. Продемонстровано здатність рекомбінантних протеїнів специфічно взаємодіяти із рецептором на поверхні чутливих до дифтерійного токсину клітин Vero та проникати всередину цих клітин шляхом ендоцитозу.

Показано здатність флуоресцентного похідного дифтерійного токсину взаємодіяти з поверхнею клітин як чутливих, так і нечутливих до дії токсину

видів тварин. Встановлено специфічність такої взаємодії та розраховано константи афінності, які виявилися майже однаковими для чутливих та нечутливих до дії токсину клітин ( $K_{a \text{ Vero}} = 3,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{a \text{ 3T3}} = 2,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Продемонстровано поглинання похідного дифтерійного токситоксину нечутливими до дії токсину клітинами шляхом ендоцитозу.

Встановлено дозозалежну здатність субодиниці В дифтерійного токсину викликати загибель клітин лінії U937 шляхом апоптозу. Показано, що така активність субодиниці В не пов'язана із взаємодією з рецептором на поверхні клітин та утворенням пор великого розміру.

Продемонстровано вплив Т-домену дифтерійного токсину на ендосомний транспорт фрагментів токсину. Показано, що Т-домен дифтерійного токсину сповільнює дозрівання ендосом, навантажених фрагментами токсину, та гальмує процес закислення їх середовища.

На основі отриманих даних дисертантом сформульовані висновки, які повністю витікають із результатів дослідження і відповідають завданням, які були поставлені при виконанні роботи.

### **Основні недоліки в роботі**

1. Слід зазначити, що в розділі “Методи дослідження” описано використання *E.coli* як продуцента рекомбінантних білків. Цей розділ необхідно було представити в огляді літератури.
2. Не зовсім зрозуміло, чому спектр збудження mNectarine на Рис.3.12 реєстрували при довжині хвилі емісії 600 нм, а не в максимумі емісії.
3. Є ряд невдалих виразів, наприклад рефолдинг проводили з подальшим виділенням (с.66).

Однак, висловлені зауваження не є принциповими і не зменшують важливість отриманих у дисертаційній роботі нових результатів.

Отже, в цілому дисертаційна робота ЛАБИНЦЕВА А. є цільним і завершеним науковим дослідженням, в якому успішно вирішені поставлені перед дисертантом задачі. Отримані в дисертаційній роботі результати

вказують на високий професійний рівень дисертанта. Основні висновки дисертаційної роботи є достатньо аргументованими і відповідають представленому експериментальному матеріалу. Всі отримані в дисертаційній роботі висновки мають як фундаментальне значення, так і практичне значення. Автореферат дисертації адекватно відображає зміст дисертації, основні положення та висновки. Матеріали дисертації повністю відтворені в наукових публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на наукових форумах.

### Резюме

Дисертаційна робота ЛАБИНЦЕВА Андрія Юрійовича «Молекулярні механізми реалізації рецептор-зв'язувальної та транспортної функції дифтерійного токсину», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є завершеною науковою працею, в якій одержані нові дані щодо функціонування дифтерійного токсину. Дисертаційна робота повністю відповідає вимогам ДАК Міністерства освіти та науки України (параграф 13), що пред'являються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

### Офіційний опонент

Член-кореспондент НАН України,  
завідувач відділу білкової інженерії та біоінформатики  
Інституту молекулярної біології і  
генетики НАН України  
доктор біологічних наук, професор



О.І. Корнелюк

Підпис *О.І. Корнелюк*  
посвідчується  
*Зав. канц. І. І. Ковалев*