

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу Харлампиевой Д.Д. «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

### **Актуальность работы.**

*Bacteroides fragilis* присутствует в нормальной микрофлоре кишечника человека. Тем не менее, была выявлена его ассоциация с развитием диареи у новорожденных ягнят. При этом было выявлено, что одни изоляты вызывают выход жидкости в просвет кишечника, а другие – нет. Первые получили название энтеротоксигенных *B. fragilis*, а вторые – неэнтеротоксигенные. Позже энтеротоксигенные *B. fragilis* были обнаружены в кале больных диареей людей. Был идентифицирован, выделен и очищен белок – фрагилизин, который энтеротоксигенные *B. fragilis* выделяют во внешнюю среду и который кодируется геном в составе островка патогенности этих бактерий. К настоящему времени накапливаются сведения о вкладе энтеротоксигенных *B. fragilis* в развитие энтероколитов и даже рака кишечника. Поэтому тема данной работы представляется весьма актуальной.

### **Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы**

Задачи, поставленные в диссертационной работе и использованные методологические подходы адекватны поставленной цели. Использованы современные методы генной инженерии, работы с клеточными культурами, биохимические методы, а также метод масс-спектрометрии. Все выводы диссертационной работы сформулированы на основе экспериментального материала и их достоверность не вызывает сомнений.

Научная новизна работы определяется следующими ее результатами:

- впервые получены все известные к настоящему времени изоформы фрагилизина в гетерологичной системе *E. coli*;
- впервые показано, что фрагилизины не расщепляют полноразмерный рекомбинантный Е-кадгерин, выделенный из различных источников (*E.coli* и клеток линии Expi293F). Таким образом, фрагилизин расщепляет Е-кадгерин не напрямую, как считалось ранее, а более сложным путем, пока неизвестным. Автор не исключает участия клеточных протеиназ в этом процессе;
- впервые идентифицированы потенциальные природные субстраты для ВFT, среди них – мембранные белки, участвующие в межклеточной адгезии и регулирующие пролиферацию, а также белки с неизвестными к настоящему времени функциями.

### **Ценность полученных результатов для науки и практики**

Автором получены данные, вносящие вклад в понимание механизмов действия фрагилизина на клетки эпителия кишечника. Применение tandemной хромато-масс спектрометрии позволило выявить, что с поверхности клеток, обработанных фрагилизином, высвобождается не только Е-кадгерин, но и ряд других белков, которые впервые идентифицированы в данной работе. Понимание механизмов действия фрагилизина позволяет оценить его вклад в развитие заболеваний, с которыми ассоциированы энтеротоксигенные *B. fragilis*, и может способствовать разработке способов их лечения и профилактики.

### **Содержание диссертации**

Реценziруемая работа содержит 136 страниц машинописного текста, иллюстрирована 12 таблицами и 32 рисунками. Список цитируемой литературы содержит 144 источника.

В **введении** обоснована актуальность проводимого исследования, сформулирована цель исследования и поставлены задачи. Приведены данные о научной новизне работы, ее теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и их аprobации, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В **обзоре литературы** проанализированы опубликованные работы, касающиеся тематики исследования. Автор подробно описывает историю обнаружения энтеротоксигенных *B. fragilis*, вырабатывающих фрагилизин. Рассмотрено строение молекулы фрагилизина и процесс созревания пробелка. Приведены и проанализированы данные о способах тестирования активности фрагилизина *in vitro* – как с использованием культур клеток, так и при помощи различных субстратов. Описано воздействие фрагилизина на клетки эпителия кишечника, особое место отведено роли энтеротоксигенных *B. fragilis* в развитии патологий кишечника. Таким образом, данный раздел свидетельствует о хорошем знании Харлампиевой Д.Д. объекта исследования и способности критически анализировать научную литературу по изучаемой проблематике.

Раздел «**Материалы и методы**» дает представление о спектре использованных в работе методов. Диссертантом были использованы современные методы генной инженерии; методы работы с белками – получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, их выделение и очистка, вестерн-блот гибридизация; методы культивирования прокариотических и эукариотических клеток; масс-спектрометрические подходы. В целом, раздел «**Материалы и методы**» написан достаточно подробно, приведенные описания позволяют при необходимости воспроизвести эксперимент. Однако к этому разделу имеется несколько замечаний, которые будут изложены ниже.

В разделах «**Результаты исследования**» и «**Обсуждение результатов**» автор приводит полученные результаты и анализирует их, сравнивает с имеющимися в литературе

сведениями по данной проблематике. В работе можно выделить несколько этапов. Сначала Харлампиева Д.Д. получает исследуемые изоформы фрагилизинов в рекомбинантном виде. Затем автор демонстрирует с помощью теста с использованием линии клеток аденокарциномы толстого кишечника человека НТ-29, что полученные фрагилизины обладают такой же активностью, как и природный аналог. Далее проведена оценка активности фрагилизинов с использованием различных субстратов. В том числе, в качестве субстрата исследован Е-кадгерин – мембранный белок, участвующий в образовании межклеточных контактов. Известно, что при обработке эпителиальных клеток фрагилизином происходит расщепление этого белка. Однако в представленной работе получены данные, что фрагилизин не расщепляет Е-кадгерин, выделенный из различных источников. Таким образом, автор заключает, что механизм гидролиза Е-кадгерины под действием фрагилизина сложнее, чем прямое расщепление полипептида протеиназой, и в этот процесс могут быть вовлечены протеиназы эукариотической клетки. Далее, для выявления потенциальных субстратов для драгилизина, с помощью tandemной хромато-масс спектрометрии были проанализированы белки, высвобождающиеся в культуральную среду после обработки ВFT клеток линии НТ-29. Среди них был обнаружен не только Е-кадгерин, но и ряд других белков, участие которых в развитии патологии кишечника еще предстоит выяснить.

К представленной работе имеются следующие замечания:

- в целом, в разделе материалы и методы достаточно подробно описаны применяемые в работе методики. Однако раздел 2.12. Определение нуклеотидной последовательности генома энтеротоксигенного изолята *B. fragilis* изложен очень кратко;
- хотелось бы видеть оформление электрофореграмм и подписей к ним в одном стиле. Также для большей наглядности и облегчения восприятия материала на электрофореграммах, иллюстрирующих фракционирование клеток штамма-продуцента, следовало бы отметить целевые белки;
- в работе анализируется активность изоформ фрагилизина, белка-металлопротеиназы. Однако данные о использовании ионов цинка в экспериментах по проверке активности представлены весьма кратко. Например, в п. 3.10. Тестирование протеолитической активности рекомбинантных ВFT с использованием желатина, азоколла, азоказеина и модифицированного тиоредоксина (стр.98) написано «Мы выявили, что все зрелые ВFT (как слитые с последовательностью из шести остатков гистидина, так и без нее), полученные в данной работе (белки №№ 2-8 в таблице 9), не расщепляют азоколл, азоказеин и желатин как в присутствии ионов цинка, так и без них», но не указана их концентрация. В разделе «материалы и методы» эти данные также отсутствуют.

Указанные недостатки не затрагивают высокой научной ценности полученных результатов и не снижают общей положительной оценки данной работы.

### **Опубликование результатов диссертации**

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в трех международных журналах, обсуждены на конференциях и представлены в соответствующих сборниках тезисов.

### **Содержание автореферата**

В автореферате достаточно полно отображено содержание диссертации и присутствуют все материалы, на основании которых сделаны выводы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Харлампиевой Д.Д. «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности» полностью соответствует требованиям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор, Харлампиева Дарья Дмитриевна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Руководитель лаборатории нейрохимии

Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии  
федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный  
медицинский исследовательский центр психиатрии  
и наркологии имени В.П. Сербского»

Министерства здравоохранения

Российской Федерации,

доктор медицинских наук

(специальность 03.00.04 - биохимия)

Адрес: 119991, г.Москва, Кропоткинский пер., д.23

Телефон: +7(495)692-02-62

E-mail: olga672@yandex.ru

Подпись д.м.н. Гуриной О.И. заверяю

Ученый секретарь федерального государственного  
бюджетного учреждения «Федеральный  
медицинский исследовательский центр психиатрии  
и наркологии имени В.П. Сербского»

Министерства здравоохранения

Российской Федерации, к.м.н.

О. И. Гурина

20. 04. 2016

С. В. Шпорт

