

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Харлампиевой Дарьи Дмитриевны на тему: «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность темы исследования

Микрофлора кишечника человека играет важную роль в поддержании местного и системного гомеостаза хозяина-макроорганизма, выполняя ряд жизненно важных функций. При нарушениях функционирования кишечной микрофлоры значительно возрастает риск развития значительного числа заболеваний. Помимо метаболических нарушений, способствующих канцерогенезу, и модулирования иммунного ответа многие бактерии продуцируют токсины, обладающие канцерогенным действием через влияние на межклеточные взаимодействия, внутриклеточную передачу сигнала или индуцирование мутаций и эпигенетические изменения.

Известно, что энтеротоксигенные штаммы *Bacteroides fragilis*, обитающие в кишечнике млекопитающих, в том числе человека, продуцируют фрагилизин, являющийся по своей сути металлопротеиназой, и индуцирующий расщепление Е-кадгерина, который играет ключевую роль в регуляции контакта «клетка–клетка» и обеспечивает межклеточную адгезию. В литературе имеются данные о роли этого процесса в развитии воспаления слизистой кишечника и колоректального рака. Однако, на сегодняшний день неизвестна субстратная специфичность фрагилизина и непонятен точный механизм его действия на клетки. Установление же механизма патогенности *Bacteroides fragilis* необходимо для успешной борьбы с вызываемыми этим микроорганизмом заболеваниями. Учитывая вышесказанное несомненная своевременность, актуальность и научно-практическая значимость диссертационной работы Харлампиевой Дарьи Дмитриевны, направленной на получение рекомбинантных фрагилизинов и исследование механизма его действия на клетки эпителия кишечника, в том числе, выявление его природного субстрата.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц и 32 рисунка. Работа написана по традиционному плану и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы», который включает 144 источника.

Основное содержание диссертации

Во введении автор обосновывает выбор темы работы, формулирует цель и задачи исследования, а также основные положения, выносимые на защиту. Подчеркивается, актуальность детального изучения механизма действия фрагилизина и выявления его природного субстрата.

Обзор литературы включает 9 разделов. Вначале излагаются общие сведения о *B. fragilis*, вводятся понятия «неэнтеротоксигенных» и «энтеротоксигенных» штаммов. Рассматривается история обнаружения фрагилизина, продуцируемого энтеротоксигенными *B. fragilis* во внешнюю среду, а также выявления изоформ данного белка. Далее автор описывает известные эффекты его воздействия на эпителиальные клетки, лежащие в основе детектирования данного белка в культуральной жидкости *B. fragilis*. В следующем разделе обзора рассмотрено строение молекулы фрагилизина и механизмы созревания пробелка, подчеркивается неизвестность механизма расщепления пробелка в природных условиях. Затем автор описывает и критически анализирует имеющиеся в литературе данные по субстратной специфичности изоформ фрагилизина *in vitro*. Далее приводятся сведения о мембранном белке Е-кадгерине, который будет исследован в данной работе в качестве природного субстрата для фрагилизина. В завершение литературного обзора рассматриваются данные о воздействии фрагилизина на эпителиальные клетки, указывающие на противоспалительный и онкогенный потенциал энтеротоксигенных *B. fragilis*. В целом, обзор дает полное представление о состоянии исследований в данной области, в нем рассмотрены все вопросы, связанные с тематикой работы.

В разделе «**Материалы и методы**» достаточно подробно изложен широкий спектр использованных при выполнении данного исследования современных

биохимических, молекулярно-биологических, микробиологических, иммунологических методов, что свидетельствует о высоком уровне профессиональной подготовки соискателя. Это во многом предопределило успешное выполнение работы. В диссертации описаны эксперименты с клетками бактерий и эукариот, создание векторов для экспрессии генов в бактериях и клетках млекопитающих, методы работы с белками (выделение и очистка рекомбинантных белков, вестерн-блот гибридизация, получение антител и др.). В работе использованы масс-спектрометрические подходы – так, для выявления потенциальных субстратов для фрагилизина с помощью tandemной хромато-масс спектрометрии были проанализированы белки, высвобождающиеся в культуральную среду после обработки фрагилизином клеток аденокарциномы толстого кишечника человека (HT-29).

В следующем разделе диссертации «Результаты исследования» Дарья Дмитриевна Харлампиева описывает проведенные исследования и излагает полученные результаты. Данный раздел можно разделить на несколько логических частей. В первой части описано получение векторов для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих исследованные в работе белки – три изоформы фрагилизина и Е-кадгерин. Следующая часть посвящена наработке и выделению рекомбинантных белков. Следует отметить, что для перевода проформы фрагилизина в зрелую форму авторами был предложен метод ограниченного трипсинолиза, основывающийся на известных литературных данных об устойчивости каталитического домена фрагилизина к действию трипсина в определенных пределах. Далее автором была протестирована активность полученных рекомбинантных фрагилизинов. Для этого использовали описанные в литературе методы: оценка изменения морфологии клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека НТ-29, а также детекция расщепления Е-кадгерина клеток данной линии после инкубации с фрагилизином. Было показано, что полученные рекомбинантные фрагилизины в данных тестах имеют такую же активность, какая описана для фрагилизина из природного источника – *B. fragilis*, и, таким образом, подходят для изучения его свойств. Далее был изучен Е-кадгерин в качестве субстрата для фрагилизина. Для этого был

получен рекомбинантный полноразмерный Е-кадгерин в различных системах экспрессии (как прокариотической, так и эукариотической), а также из клеток линии НТ-29 выделены обогащенные Е-кадгерином фракции. Автором показано, что фрагилизин не расщепляет Е-кадгерин напрямую *in vitro*, а его расщепление происходит только при обработке фрагилизином интактных клеток НТ-29, и для этого необходима нативная структура активного центра белка, характерного для металлопротеиназ. Учитывая полученные результаты, логическим продолжением работы является и ее следующая часть – идентификация потенциальных природных субстратов для фрагилизина. Для этого был проведен протеомный анализ культуральной среды после инкубации клеток линии НТ-29 с рекомбинантным фрагилизином. В результате был впервые обнаружен и идентифицирован ряд потенциальных природных субстратов для изоформы 2 фрагилизина, в том числе мембранные белки, участвующие в межклеточной адгезии, регуляции пролиферации клеток и белки с неизвестными пока функциями.

В разделе «**Обсуждение результатов**» автор критически анализирует полученные результаты и сопоставляет их с данными, имеющимися в мировой литературе.

Для решения поставленных задач в работе был использован широкий спектр самых современных методов. Полученные результаты проанализированы с учетом данных, описанных в литературе по данной тематике. Все научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены фактическим материалом. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Научная новизна

В ходе выполнения диссертационной работы Харлампиевой Дарьей Дмитриевной был разработан способ получения активного зрелого фрагилизина из пробелка и впервые получены все три известные к настоящему времени изоформы фрагилизина в гетерологичной системе экспрессии *E. coli*. Установлено, что зрелые рекомбинантные фрагилизины вызывают изменение морфологии клеток линии НТ-29 и приводят к расщеплению Е-кадгера в интактных клетках этой линии. Впервые показано, что фрагилизин не расщепляет полноразмерный рекомбинантный Е-кадгерин, выделенный из *E. coli* и клеток линии Exp293F, а

также не использует в качестве субстратов желатин, азоколл и азоказеин. Автор вполне справедливо полагает, что гидролиз Е-кадгерина под действием фрагилизина сложнее, чем прямое расщепление полипептида протеиназой и происходит не напрямую, а путем пока неизвестного механизма. Впервые идентифицированы белки, высвобождающиеся с поверхности клеток HT-29 после обработки фрагилизином.

Практическая значимость

Результаты диссертационной работы имеют важное значение для расширения наших представлений о молекулярных механизмах действия фрагилизина на эпителиальные клетки кишечника. От решения этого вопроса во многом зависит разработка новых эффективных подходов к лечению и профилактике заболеваний, обусловленных персистенцией энтеротоксигенных штаммов *B. fragilis* в организме человека. Разработанный в ходе выполнения диссертационной работы способ выделения активных рекомбинантных фрагилизинов позволяет получить чистый препарат белка, который необходим для изучения механизмов взаимодействия фрагилизинов с клетками кишечника и его роли в развитии патологических состояний. При этом следует отметить, что ранее описанные в литературе методы выделения фрагилизина из культуральной жидкости *B. fragilis* являются многостадийными и характеризуются низким выходом. Все это обуславливает практическую значимость работы и демонстрирует широкие возможности применения полученных данных.

Соответствие работы требованиям, предъявляемым к диссертациям

В целом работа выполнена в соответствии с требованиями ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Она логично построена, хорошо иллюстрирована, имеет четкую структуру, содержит большой объем фактического материала, с объективным анализом результатов собственных исследований. Список литературы включает в себя большое количество источников, охватывающих исследования по тематике работы.

Выводы вытекают из материалов проведенного исследования, полностью основаны на полученных экспериментальных результатах и отражают основные положения работы.

Содержание автореферата полностью отображает основные положения диссертации.

Основные результаты диссертации достаточно полно отражены в трех зарубежных публикациях в журналах, удовлетворяющих перечню рецензируемых изданий ВАК РФ, представлены на 5-ти международных и российских конференциях.

Общие замечания по диссертационной работе

Диссертация написана хорошим литературным языком, найти какие-либо неточные формулировки, опечатки не представляется возможным.

Есть небольшое замечание, не имеющее принципиального значения. Это касается изложения результатов экспериментов по очистке рекомбинантных фрагилизинов и Е-кадгеринов. Хотелось бы видеть в главе «Результаты» количественную характеристику способа выделения, что касается выхода целевого продукта, степени очистки и др. показателей, иными словами таблицу очистки. Правда, в диссертации в разделе «Обсуждение результатов» имеется упоминание о том, что разработанный способ выделения и очистки фрагилизинов характеризуется на порядок большим выходом описанных в литературе методов: 500-1000 мкг активного зрелого фрагилизина на 1 л среды против 32-80 мкг. Кроме того, хотелось бы видеть в главе «Обзор литературы» небольшой раздел относительно имеющихся данных по способам очистки рекомбинантных фрагилизинов и кадгеринов.

Наконец следует упомянуть о соотношении размеров отдельных глав диссертации. Это касается главным образом разделов «Материалы и методы» и «Результаты», которые изложены соответственно на 30 и 32 страницах. Имел бы смысл сократить объем первого раздела и увеличить размер второго.

Однако вышеуказанные замечания ни коей мере не снижают научно-практическую значимость результатов проведенного исследования.

Заключение

Таким образом, считаю, что диссертационная работа Харлампиевой Дарьи Дмитриевны «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности» является законченным научно-

квалификационным исследованием, посвящена актуальной теме, выполнена на современном методическом уровне и соответствует требованиям, изложенными в п.9 Положения ВАК РФ «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор, Харлампиева Дарья Дмитриевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - «Биохимия».

Заведующий лабораторией медицинской биотехнологии
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский
институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
доктор биологических наук
(специальность 03.01.04 - биохимия),
профессор

Соколов Николай Николаевич

Адрес: 119121 Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.8
E-mail: Sokolov2144@yandex.ru; Nikolai.Sokolov@ibmc.msk.ru
Телефон: +7 499 246 3380

Подпись д.б.н., профессора Соколова Н.Н. заверяю
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»,
кандидат химических наук

Карпова Елена Анатольевна

