

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Харлампиевой Дарьи Дмитриевны «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.04 - биохимия.

Предметом исследования диссертационной работы Харлампиевой Дарьи Дмитриевны является фрагилизин или BFT – секретируемый белок *Bacteroides fragilis*, который вызывает накопление жидкости в перевязанных петлях кишечника, повреждения кишечника, воспаление, некроз и гемморагию. Каталитический домен этого белка содержит мотив, характерный для металлопротеиназ клана метцинкина. Причиной патогенных свойств BFT считается его способность расщеплять Е-кадгерин, что приводит к нарушению межклеточных плотных контактов. Расщепление Е-кадгерина приводит к активацииprotoонкогенного каскада, регулируемого  $\beta$ -катенином. Строгих доказательств прямого расщепления Е-кадгерина белком BFT до сих пор не получено. Детальное выяснение механизма действия BFT и выявление природных его субстратов является актуальной задачей.

В работе были получены все известные к настоящему времени изоформы BFT в виде рекомбинантных белков. Харлампиевой Д.Д. детально описан разработанный способ получения зрелого активного BFT из пробелка. Получение чистого препарата белка крайне важно для изучения его свойств. Согласно данным литературы, основной эффект воздействия BFT на клетки эпителия кишечника, обитателем которого является *B. fragilis*, – нарушение межклеточных контактов. Имеются данные о BFT-индуцированном расщеплении Е-кадгерина, белка, играющего важную роль в межклеточной адгезии. В диссертационной работе изучено воздействие BFT на Е-кадгерин. Получены также данные, свидетельствующие о высвобождении фрагментов мембранных белков с поверхности клеток после их обработки BFT. Эти белки были впервые идентифицированы в ходе данной работы. Дальнейшее их изучение, безусловно, внесет вклад в понимание механизма воздействия BFT на эпителиальные клетки.

К сожалению, автору не удалось показать прямого расщепления Е-кадгерина белком BFT *in vitro*, несмотря на использование различных систем. Е-кадгерин был выделен в рекомбинантной форме из клеток *E.coli*, из клеток линии Expi293F. Использовали белковую фракцию клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека НТ-29, обогащенную Е-кадгерином. Ни в одной из использованных систем не было выявлено расщепления Е-кадгерина белком BFT. Расщепление наблюдали только в случае обработки клеток препаратом изоформы mBFT2-His. Данные полученные в этом эксперименте проиллюстрированы двумя способами: фотография клеток, на которой видны «ошаренные» клетки, что свидетельствует о нарушении межклеточных контактов, а также Вестерн-блот гибридизация с антителами к Е-кадгерину. Для первой иллюстрации не хватает контрольных точек. Изоформа mBFT2-His была получена в

результате ограниченного протеолиза исходного белка prBFT2-His. Несмотря на последующую очистку при помощи металлохелатной хроматографии нельзя исключить присутствие следовых количеств трипсина в препарате белка, которые при длительной инкубации с клетками могут приводить к потере межклеточных контактов. В этом случае в качестве контроля можно было использовать препарат prBFT2-His, к которому в процессе очистки добавляли трипсин, но не инкубировали, а сразу переходили к металлохелатной хроматографии. Это позволило бы получить непроцессированный белок, но он содержал бы следовые количества трипсина, который возможно и приводит к «ошариванию» клеток. Вестерн-блот гибридизация с антителами к Е-кадгерину лизатов клеток HT-29 после инкубации с prBFT2-His и mBFT2-His демонстрирует количественную деградацию Е-кадгерина после 1 часовой обработки клеток препаратом рекомбинантного белка mBFT2-His. В случае демонстрации данных методом Вестерн-блота широко распространен прием гибридизации с антителами к белкам, количество которых остается неизменным в условиях проводимого опыта, что позволяет наглядно продемонстрировать, что анализу подверглись одинаковые количества лизатов клеток. В данном случае такой контроль нанесения отсутствует. Также достаточно странным выглядит факт полного отсутствия сигнала от продуктов деградации Е-кадгерина. BFT2 является металлопротеиназой, для которой в предыдущих работах были выявлены характерные мотивы расщепления. Можно предположить, что расщепление Е-кадгерина должно приводить к образованию набора фрагментов, которые могут быть обнаружены при помощи Вестерн-блот гибридизации с антителами к Е-кадгерину.

Эти сомнения в частичной мере могут быть развеяны последующей демонстрацией того, что мутации в активном сайте mBFT2 инактивируют белок. Такой белок не проявляет биологической активности в отношении клеток линии HT-29. К сожалению, вторая часть работы плохо иллюстрирована, несмотря на достаточно большой объем работы. В автореферате приводится описание большого количества проведенных опытов, однако, отсутствуют рисунки, их иллюстрирующие.

Несомненно, выигрышно выглядит завершение работы, в котором автору удалось выявить новые субстраты белка BFT2, проведя tandemную хромато-масс спектрометрию образцов культуральной жидкости клеток линии HT-29, обработанных mBFT2-His. Обнаружено, что расщеплению подвергаются как белки из суперсемейства кадгеринов, так и многие другие мембранные белки, имеющие внеклеточные домены. На основании проведенного анализа выявлено, что белок BFT имеет сходство с протеиназами семейства ADAMs, участвующими в отщеплении внеклеточных доменов трансмембранных белков.

Отмеченные недостатки ни в коей мере не снижают значимость и новизну полученных в настоящей диссертационной работе данных.

Автореферат дает полное представление о содержании работы, использованных методах и объеме исследования. Полученные данные достоверны, а выводы диссертационной работы

подтверждены фактическим материалом. Результаты работы представлены в трех статьях и обсуждены на конференциях, как всероссийских, так и международных.

По объему, новизне и научной значимости работа Харлампиевой Дарьи Дмитриевны соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а ее автор Харлампиева Д.Д. заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Старший научный сотрудник  
кафедры Химии природных соединений  
Химического факультета  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Московский государственный университет  
имени М.В.Ломоносова»,  
кандидат химических наук

Рубцова Мария Петровна

«12» апреля 2016 г.

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

Телефон: +7 (495) 939-54-18

E-mail: mprubtsova@gmail.com

Подпись старшего научного сотрудника, к.х.н. Рубцовой М.П. заверяю

