

## ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

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

Фрагилизин синтезируется энтеротоксигенными *Bacteroides fragilis*, содержащими в своем геноме островок патогенности. Согласно литературным данным, персистенция таких штаммов в кишечнике человека ассоциирована с развитием энтероколитов и даже рака. Понимание механизмов патогенности *B. fragilis* необходимо для успешной борьбы с вызываемыми им заболеваниями, поэтому тематика работы представляется весьма актуальной.

В работе можно выделить два основных направления. Первое – это получение рекомбинантных белков и разработка способа получения активного зрелого фрагилизина; второе – исследование воздействия рекомбинантных белков на клетки и поиск их природного субстрата.

Ввиду того, что выделение фрагилизина из культуральной жидкости *B. fragilis* является многостадийным процессом и характеризуется низким выходом, необходимо было разработать способ получения рекомбинантного белка. До проведения настоящего исследования не было работ, в которых все известные к настоящему времени изоформы фрагилизина были бы выделены из одного источника и охарактеризована их активность на одних и тех же субстратах. В ходе данной работы фрагменты ДНК, кодирующие три известные изоформы профрагилизина, были клонированы в векторы для регулируемой экспрессии в клетках *E.coli*. Далее были получены штаммы-продуценты, выделены рекомбинантные белки и разработан способ получения активного зрелого фрагилизина из пробелка методом ограниченного трипсинолиза. Полученные рекомбинантные белки имели такую же биологическую активность, как и описанный в литературе фрагилизин, выделенный из культуральной жидкости *B. fragilis*: при обработке клеток линии HT-29 рекомбинантными фрагилизинами происходило изменение формы клеток – округление; а также расщепление белка, участвующего в образовании межклеточных контактов – Е-кадгерина. Автором было показано, что Е-кадгерин не является непосредственным субстратом для фрагилизина *in vitro*. Впервые было продемонстрировано, что фрагилизин не расщепляет полноразмерный рекомбинантный Е-кадгерин, выделенный из *E.coli* и клеток линии Expi293F. Е-кадгерин в изолированных клеточных фракциях также не расщепляется при инкубации с фрагилизином. Также продемонстрировано, что инкубация клеток с

фрагилизином вызывает высвобождение в культуральную среду ряда белков, которые были идентифицированы в данной работе методом tandemной хроматомасс-спектрометрии. Ряд выявленных белков участвует в межклеточной адгезии, есть данные об участии некоторых белков в регуляции процессов клеточной пролиферации, для некоторых белков функции не установлены.

В целом, работа выполнена на высоком уровне, использованы самые современные молекулярно-биологические и биохимические методы. Выводы основываются на экспериментальных данных. Полученные в работе данные расширяют представление о механизмах действия фрагилизина на клетки эпителия.

Основные результаты, полученные в работе, опубликованы в трех международных журналах и апробированы на международных и всероссийских конференциях. Реферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ.

Таким образом, диссертационная работа Харлампиевой Дарьи Дмитриевны «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis* и исследование их биологической активности» соответствует требованиям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Зав. лабораторией функциональной геномики,  
Федерального государственного бюджетного  
Учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова  
Российской академии наук,  
Адрес: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д.3  
Телефон: +7 499 132 08 74  
E-mail: brouskin@vigg.ru  
кандидат биологических наук

  
С.А. Брускин

19 апреля 2016 г.

#### «Подпись С.А. Брускина заверяю»

Ученый секретарь  
Федерального государственного бюджетного  
Учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова  
Российской академии наук,  
д.б.н.

  
О.А. Огракова

