

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от «19» мая 2016 г. № 8 о присуждении
Харлампиевой Дарье Дмитриевне, гражданство Российской Федерации, учёной
степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Получение рекомбинантных фрагилизинов *Bacteroides fragilis*
исследование их биологической активности» по специальности 03.01.04 Биохимия принята
к защите 25 февраля 2016 года (протокол № 2) диссертационным советом Д 002.247.01 на
базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва,
Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства
образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007г. с учётом изменений в составе
Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013г. №74/нк и от
10.02.2014г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Харлампиева Дарья Дмитриевна, 1985 года рождения, в 2006 г.
окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по
специальности «Биохимия». С октября 2009 г. Харлампиева Д.Д. работает в лаборатории
генной инженерии Федерального государственного учреждения
«Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» Федерального
медико-биологического агентства (ФГУ «НИИ ФХМ» ФМБА России) в должности
младшего научного сотрудника. В октябре 2010 г. поступила в очную аспирантуру ФГУ
«НИИ ФХМ» ФМБА России, с декабря 2011 г. по сентябрь 2013 г. продолжила обучение в
аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального
медико-биологического агентства» (ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России). После окончания
аспирантуры и по настоящее время Харлампиева Д.Д. работает в должности младшего

научного сотрудника в лаборатории генной инженерии ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России (в октябре 2015 г. переименовано в Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)).

Диссертационную работу Харлампиева Д.Д. выполняла в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», в лаборатории генной инженерии.

Научный руководитель – Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», заведующий лабораторией генной инженерии.

Официальные оппоненты:

Соколов Николай Николаевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», заведующий лабораторией медицинской биотехнологии;

Гурина Ольга Ивановна, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель лаборатории нейрохимии Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своём положительном заключении, подписанным заведующим лаборатории клеточной микробиологии, доктором биологических наук Логуновым Денисом Юрьевичем указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, обладающим научной новизной и практической значимостью и соответствует критериям, изложенным в п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013), а ее автор, Харлампиева Д.Д., заслуживает присуждения искомой степени кандидата

биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, профессор Соколов Николай Николаевич является специалистом в области изучения бактериальных ферментов и их свойств, а также в области биотехнологии и получения рекомбинантных белков, и имеет работы по данным направлениям; доктор медицинских наук Гурина Ольга Ивановна имеет специальность «биохимия», в область ее интересов входит получение рекомбинантных белков и антител к ним, что подтверждается публикациями по данной тематике. Выбор ведущей организации обоснован активно ведущимися исследованиями в области медицинской микробиологии, генетики и молекулярной биологии бактерий, включая изучение структурно-функциональных свойств токсинов и факторов патогенности бактерий, а также наличием высококвалифицированных специалистов, проводящих исследования в данной области.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 8 публикациях, в том числе:

в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. Kharlampieva D.D., Manuvera V.A., Podgorny O.V., Kovalchuk S.I., Pobeguts O.V., Altukhov I.A., Alexeev D.G., Lazarev V.N., Govorun V.M. Purification and characterisation of recombinant *Bacteroides fragilis* toxin-2 // Biochimie. 2013. Vol. 95. No 11. P. 2123-2131.

2. Nikitina A.S., Kharlampieva D.D., Babenko V.V., Shirokov D.A., Vakhitova M.T., Manolov A.I., Shkoporov A.N., Taraskina A.E., Manuvera V.A., Lazarev V.N., Kostryukova E.S. Complete Genome Sequence of an Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Clinical Isolate // Genome Announc. 2015. Vol. 3. No 3. pii: e00450-15.

3. Kharlampieva D., Manuvera V., Podgorny O., Grafskaia E., Kovalchuk S., Pobeguts O., Altukhov I., Govorun V., Lazarev V. Recombinant fragilysin isoforms cause E-cadherin cleavage of intact cells and do not cleave isolated E-cadherin // Microbial Pathogenesis. 2015. Vol. 83-84. P. 47-56.

и 5 тезисах в материалах российских и международных конференций.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведённые в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Соколова Н.Н. положительный.

Отзыв содержит следующие замечания: «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. Имело бы смысл сократить объем первого раздела и увеличить размер второго».

Отзыв официального оппонента доктора медицинских наук Гуриной О.И. положительный.

Отзыв содержит 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 ВФТ 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».

Отзыв Ведущей организации федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

«1. На рисунке 24, иллюстрирующем результаты Вестерн-блот гибридизации белков из культуральной жидкости *B. fragilis* с антителами к ВFT, необходимо представить маркер молекулярных масс.

2. В работе изучали три изоформы фрагилизина *B. fragilis*. Однако на части рисунков, иллюстрирующих полученные результаты, представлены данные только для одной из изоформ, и в подписи к рисунку или в тексте диссертации указано, что для остальных изоформ результаты были такими же (например, рисунок 25), а на других рисунках приведены данные для всех трех изоформ, хотя различий между ними не наблюдалось (например, рисунок 29). Следовало выбрать единый формат иллюстрирования результатов исследования.

3. В работе были идентифицированы фрагменты мембранных белков клеток линии НТ-29, количество которых увеличивается в культуральной среде после обработки клеток посредством ВFT. Проводили ли исследования изменения внутриклеточных белков после обработки клеток ВFT?».

На автореферат поступили положительные отзывы от:

- старшего научного сотрудника лаборатории механизмов регуляции иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кандидата биологических наук Хромых Людмилы Мендельевны;

- заведующего лабораторией нейрорецепторов и нейрорегуляторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), доктора химических наук Козлова Сергея Александровича;

-заведующего лабораторией функциональной геномики Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, кандидата биологических наук Брускина Сергея Александровича;

- старшего научного сотрудника Отдела структуры и функций РНК Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», кандидата химических наук Рубцовой Марии Петровны. В отзыве приведены следующие замечания: «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 НТ-29 после инкубации с prBFT2-His и mBFT2-His демонстрирует количественную деградацию Е-кадгерины 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-кадгерины. BFT2 является металлопротеиназой, для которой в предыдущих работах были выявлены характерные мотивы расщепления. Можно предположить, что расщепление Е-кадгерины 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 НТ-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».

В дискуссии приняли участие:

Левицкий Дмитрий Иванович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»;

Кострюкова Елена Сергеевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией постгеномных исследований в биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- Разработан способ получения и выделения активных рекомбинантных BFT изоформ 1, 2, 3, включающий в себя процессинг prBFT путем ограниченного трипсинолиза;
- полученные рекомбинантные BFT обладают такой же активностью в отношении клеток линии аденокарциномы толстого кишечника человека (HT-29), как и BFT из природного источника – *B. fragilis*;
- впервые показано, что рекомбинантные зрелые изоформы BFT не расщепляют рекомбинантный полноразмерный Е-кадгерин, выделенный из *E.coli* клеток линии Expi293F. Таким образом, BFT расщепляет Е-кадгерин не напрямую, как считалось ранее, а более сложным путем, пока неизвестным;
- впервые идентифицированы потенциальные природные субстраты для BFT, среди них – мембранные белки, участвующие в межклеточной адгезии и регулирующие пролиферацию, а также белки с неизвестными к настоящему времени функциями.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Разработан способ получения и выделения активных рекомбинантных BFT изоформ 1, 2, 3, впервые получены все три описанные в литературе изоформы BFT в гетерологичной системе экспрессии *E. coli*.

Впервые показано, что BFT 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 BFT. Таким образом, BFT

расщепляет Е-кадгерин не напрямую, как считалось ранее, а более сложным путем, пока неизвестным.

Подобно протеиназам семейства ADAMs, с которыми BFT имеет высокую степень структурного сходства, BFT вызывает высвобождение с поверхности клеток ряда белков, среди которых, возможно, присутствуют его потенциальные субстраты. Эти белки были впервые идентифицированы в данной работе. В дальнейшем предстоит показать роль этих белков в развитии патологий, связанных с присутствием энтеротоксигенных штаммов *B. fragilis* в организме человека.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- результаты диссертационной работы имеют важное значение для расширения 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 энтеропатогенных штаммов *B. fragilis* в организме человека;

- разработанный в ходе выполнения диссертационной работы способ выделения активных рекомбинантных фрагилизинов позволяет получить гомогенный 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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- используемые методики исследования и проведённые расчёты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений, результаты получены на современном оборудовании и хорошо воспроизводимы;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы, отражают наиболее значимые результаты работы и полностью подтверждены экспериментальными данными.

Личный вклад соискателя состоит в:

- получении всех экспериментальных данных либо соискателем самостоятельно, либо при его непосредственном участии;
- обработке и интерпретации экспериментальных данных;
- участии в апробации результатов исследования;
- подготовке публикаций по выполненной работе.

Диссертация Харлампиевой Д.Д. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого арсенала современных методов и взаимосвязанностью выводов и результатов.

На заседании «19» мая 2016 года диссертационный совет принял решение присудить Харлампиевой Дарье Дмитриевне учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 17 докторов наук, 12 докторов биологических наук, 5 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: «за» - 18, «против» - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

доктор химических наук, профессор

Б.Б. Дзантиев

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

Кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский



«19» мая 2016 г.