



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

410049, г.Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13.
Тел.: (845-2) 97-04-44, 97-04-03. Факс: (845-2) 97-04-44, 97-03-83.
E-mail: mail@ibppm.ru, http://ibppm.ru
ОКПО 04740828, ОГРН 1026402489013, ИНН/КПП 6451105279/645101001

№ 12322-01-1.4-268 от 01.06.2017г.
на _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук
д.х.н., профессор
С.Ю. Щёголев



«30» мая 2017 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
на диссертационную работу Кудряковой Ирины Валерьевны «Биогенез
везикул *Lysobacter* sp. XL1», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.04 – биохимия**

Актуальность темы диссертации для науки и практики

Везикулы грамотрицательных бактерий представляют собой сферические структуры, образованные из внешней мембраны. В состав везикул входят фосфолипиды, липополисахарид и белки внешних мембран, компоненты периплазмы, а у некоторых бактерий цитоплазмы и цитоплазматической мембраны. У патогенных бактерий везикулы содержат факторы вирулентности. За счет способности к везикулообразованию бактерии усиливают свои защитные механизмы, расширяют экологические ниши и обмениваются информацией с окружающей средой. В связи с открывшимися специфическими функциями везикул, их изучение в последнее десятилетие резко возросло. В настоящее время особое внимание уделяется особенностям их образования, т.е. биогенезу. Сейчас известно

несколько моделей, описывающих этот процесс, из которых очевидно, что везикулообразование происходит под влиянием определенных факторов, которыми чаще всего являются компоненты клеточной оболочки. Основная научная проблема заключается в установлении этих факторов и механизмов их действия.

Lysobacter sp. XL1 отличается способностью образовывать везикулы и секретировать с их помощью один из бактериолитических ферментов – литическую протеазу Л5. Внеклеточные бактериолитические ферменты разрушают пептидогликан конкурентных бактерий. Интересным является факт, что эта бактерия продуцирует гомологичную белку Л5 литическую протеазу Л1, которая использует другой путь секреции. Секреция белка Л5 посредством везикул позволила предположить его роль в биогенезе этих структур. Следует отметить, что информации о топогенезе бактериолитических ферментов в литературе практически нет, и белков с такой функциональной активностью выделено и описано незначительное количество.

Бактериолитические ферменты являются ценными для биомедицины белками, которые могут быть использованы для борьбы с патогенными микроорганизмами. Для литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1 показано, что они эффективно гидролизуют клетки устойчивых к антибиотикам штаммов. Причем в составе везикул спектр их литического действия значительно расширяется. В настоящее время проблема антибиотикорезистентности сводит на нет достижения современной медицины в борьбе с патогенными бактериями. В связи с этим, поиск и создание высокоэффективных антимикробных препаратов на основе бактериолитических ферментов может внести существенный вклад для решения данной проблемы.

В связи с этим цель диссертационной работы Кудряковой И.В. – изучить роль белка Л5 и фосфолипидов мембран в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1, а также поставленные для ее достижения задачи:

1. Установить роль белка Л5 в биогенезе секреторных везикул *Lysobacter* sp. XL1.
2. Изучить роль фосфолипидов в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1.
3. Установить пространственные структуры гомологичных белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 и провести их сравнительную характеристику.
4. Определить тип гидролизуемых связей белком Л5 *Lysobacter* sp. XL1 в пептидогликане стафилококка.
5. Разработать подходы к созданию антимикробных препаратов на основе белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

безусловно, являются актуальными для биохимии, а также для биомедицины.

Степень обоснованности научных результатов и выводов и новизна исследований

Диссертационная работа Кудряковой И.В. является комплексным исследованием, позволяющим оценить полноту решения поставленных задач.

Ирина Валерьевна провела серию экспериментов, подтверждающих роль белка Л5 и фосфолипидов внешних мембран в биогенезе везикул грамотрицательной бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Данные факторы ранее не были описаны в качестве участников биогенеза бактериальных везикул. На основании полученных данных автором было выдвинуто предположение о структурно-функциональных особенностях белка Л5, которые обуславливают способность провоцировать везикулообразование. В доказательство этому были проведены структурно-функциональные исследования белка Л5 в сравнении с гомологичным белком Л1, также продуцируемым *Lysobacter* sp. XL1, которые позволили выявить такие особенности. Важным было предположение о формировании амилоидов белком Л5, которое также нашло подтверждение в данной работе. Следует отметить, что ранее не было показано такой способности для бактериолитических ферментов. Совокупность данных позволила предложить схему биогенеза везикул *Lysoabcter* sp. XL1. Для более полной

характеристики белка Л5 изучена его специфичность действия в отношении пептидогликана стафилококка. Логичным завершением можно считать результаты по конструированию антимикробных препаратов на основе белка Л5, которые были получены благодаря проведенном фундаментальному исследованию.

В работе можно проследить обоснованную логику предположений и их убедительных доказательств с использованием современных методов биохимии. Все выше сказанное позволяет утверждать об обоснованности сформулированных выводов и их новизне.

Общая оценка работы

Работа оформлена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 8 таблиц и 34 рисунка. Список литературы включает 360 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность темы исследования и следующие из этого цель и задачи.

Обзор литературы составлен по материалам отечественных и зарубежных исследований (свыше 300 источников) и включает четыре подраздела, в которых в полной мере представлена информация о структуре клеточной стенки, о внешнемебранных везикулах и бактериальных внеклеточных ферментах. Представленная структура логична и позволяет составить общее представление о протекающих процессах в клеточной оболочке бактерий, одним из которых является биогенез везикул. Этому процессу уделено особое внимание. После прочтения данной главы можно заключить, что внешнемебранные везикулы формируются из локусов во внешней мембраны бактерии под действием различных факторов, многие из которых до сих пор не изучены. Везикулы значительно расширяют возможности бактериальной клетки, выполняя жизненно важные для нее функции, например, секрецию биологически активных компонентов, в том числе литических белков, как у *Lysobacter* sp. XL1. В настоящее время

исследований, посвященных изучению особенностей топогенеза бактериальных литических белков, проведено лишь одно (для α -литической протеазы *Lysobacter enzymogenes*). Приведенные сведения значительно облегчают оценку соответствия проделанной диссертантом работы мировому уровню исследований. Представленное резюме по еще нерешенным вопросам в конце главы «Обзор литературы» свидетельствует о понимании И.В. Кудряковой современного состояния проблемы.

Глава «Материалы и методы» свидетельствует о том, что для реализации поставленных в диссертационной работе задач автором был использован широкий набор методов. Следует отметить разносторонность методических подходов для подтверждения выдвинутых гипотез и предположений. Видно также, что автор плодотворно сотрудничает не только со специалистами из других подразделений ИБФМ РАН, но и других организаций и академических институтов. Это позволило автору провести масштабное исследование.

Экспериментальные данные подробно описаны и сведены в 24 рисунка и 8 таблиц. Автором проделан внушительный объем экспериментальной работы. Важным достижением работы И.В. Кудряковой является установление факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1. Было установлено, что *Lysobacter* sp. XL1 образует две субпопуляции везикул, отличающихся по размеру, плотности и белковому составу. Доказано, что в качестве фактора, обуславливающего формирование особой группы секреторных везикул, является секретируемый белок Л5. Установлено, что рекомбинантный белок Л5 в гетерологичной системе экспрессии *Pseudomonas fluorescens* Q8-87/B секретируется таким же способом, как у *Lysobacter* sp. XL1, то есть посредством везикул. Впервые установлен фосфолипидный состав везикул и внешних мембран *Lysobacter* sp. XL1. Показано, что еще одним фактором биогенеза везикул (всего пула) является кислый фосфолипид кардиолипин.

Очень интересный результат получен при изучении пространственных структур гомологичных белков Л1 и Л5. Для белка Л5 установлены структурные особенности, позволяющие приблизиться к пониманию причин различий в топогенезе и специфичности этих белков. В функциональном плане для белка Л5 впервые показана способность к формированию упорядоченных амилоидных структур, что не было изучено ранее для внеклеточных ферментов. Это свойство позволяет объяснить механизм влияния белка Л5 на биогенез везикул.

Важным практическим достижением работы является разработка «формулы» эффективных антимикробных препаратов известного состава на основе литического белка Л5, обладающих сильным литическим действием в отношении живых патогенных бактерий родов *Bacillus* и *Staphylococcus*, являющихся клиническими изолятами. Также обнаружен лечебный эффект одного из препаратов (комплекс экзополисахарида и белка Л5) в отношении стафилококкового сепсиса, смоделированного у мышей.

Важно, что автор использовал результаты фундаментальных исследований для решения прикладных задач, а именно для разработки подходов к созданию антимикробных препаратов нового поколения на основе бактериолитических ферментов, известных своими антимикробными свойствами. Аргументированность основных положений работы И.В. Кудряковой не вызывает сомнений.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты, полученные И.В. Кудряковой, представляют несомненную ценность для развития различных фундаментальных направлений биохимии микроорганизмов (биохимия клеточной поверхности, микробная энзимология, секреция внеклеточных белков).

Следует особо выделить практическую значимость работы, заключающуюся в создании подходов к разработке антимикробных препаратов нового поколения для борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты исследования И.В. Кудряковой, представленные в диссертационной работе, целесообразны для включения в курсы лекций по микробиологии и биохимии микроорганизмов в ВУЗах страны для студентов, обучающихся по биологическим и медицинским специальностям.

Разработанные подходы для конструирования антимикробных препаратов нового поколения могут быть использованы для создания высокоэффективных препаратов на основе отдельных литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1.

Основные положения диссертационной работы полностью изложены в автореферате.

Результаты диссертации прошли необходимую апробацию. По материалам диссертации И.В. Кудряковой опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах (из них 5 – в иностранных журналах), рекомендуемых ВАК. Работа прошла апробацию на 9 международных конференциях, из них 3 проходили на английском языке.

При ознакомлении с диссертацией возникли следующие замечания и вопросы дискуссионного характера:

1. Как можно объяснить тот факт, что в экспериментах по изучению литического действия препаратов при добавлении гомогенного белка Л5 к раствору живых клеток стафилококка происходило повышение поглощения суспензии по сравнению с контрольным вариантом?
2. В разделе «Материалы и методы» отсутствует информация, с помощью каких программ проводился сбор и обработка дифракционных данных, полученных с кристаллов белков Л1 и Л5. Кроме того, не приведена сама таблица статистических данных кристаллографии.
3. С чем может быть связан процесс одновременной секреции двух литических протеаз *Lysobacter* sp. XL1 (белки Л1 и Л5) двумя разными путями? Почему это может быть «выгодно» бактериальной клетке?

Однако эти замечания не умаляют значимость полученных результатов и высокий научный уровень работы.

Заключение

Диссертация Ирины Валерьевны Кудряковой, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой изложены результаты, имеющие существенное значение для биохимии.

Диссертация полностью соответствует всем требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, а ее автор – Кудрякова Ирина Валерьевна – заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Работа обсуждена на расширенном заседании лаборатории экологической биотехнологии (протокол № 4 от 30 мая 2017 года).

Ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

доктор биологических наук

Н.Н. Позднякова

Подпись Наталии Николаевны Поздняковой заверяю:
Ученый секретарь ИБФРМ РАН
кандидат биологических наук



(Handwritten signature)

Т.Е. Пылаев

410049 Саратов, Проспект Энтузиастов, д. 13, ИБФРМ РАН
Тел.: +7 (8452) 970444, E-mail: pozdnyakova_n@ibppm.ru

30 мая 2017 г.