

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

Актуальность темы диссертации

Тема диссертационного исследования И.В. Кудряковой является актуальной не только для решения фундаментально-ориентированных задач на стыке биохимии и микробиологии, но и, как следует уже из полученных результатов, в связи с практическим значением. В русле биохимии актуальность работы обусловлена важностью изучения структуры, функций и механизмов секреции белков с гидролитическими свойствами из бактериальных клеток. Для микробиологии тема диссертации важна в связи с недостаточностью сведений о функциональной роли везикул, образуемых из наружных мембран и компонентов клеточных оболочек бактерий, особенно в осуществлении межклеточных взаимодействий или протекторных функций как ловушек токсикантов. Следует отметить, что везикулы бактерий стали предметом детального изучения в немногих коллективах российских и зарубежных исследователей, а в статьях лишь констатировали их образование. В практическом плане актуальность работы обусловлена важностью разработок препаратов на основе везикул с белком, обладающих антимикробным действием в отношении широкого круга микроорганизмов, особенно патогенных и устойчивых к различным антибиотикам.

Степень обоснованности научных результатов и выводов и новизна исследований

Изложенные в диссертации И.В. Кудряковой научные результаты были получены с применением большого набора современных биохимических, инструментальных и электронно-микроскопических методов. Использование комбинаций методик препаративного выделения, электрофоретического анализа и иммуноблотинга обусловило достоверное выявление белка Л5 в определенной фракции везикул. Достоверность наличия литической активности везикулярной формы белка Л5 подтверждена различными биохимическими и микробиологическими тестами с использованием культур живых клеток, препаратов из убитых клеток, а также пептидогликана. Результаты, убедительно свидетельствующие об особенностях гидролиза пептидогликана белком Л5, были получены с использованием флюорогенного субстрата и анализа аминокислотного состава гидролизатов. В целом, достоверность результатов исследования обеспечена применением системы разных тестов,

когда, например, биохимические и цитохимические методы приводили к сходным заключениям.

Подробное изложение примененных методов и убедительная документация результатов (в виде электрофореграмм, электронно-микроскопических снимков, хроматограмм, снимков зон лизиса поверхностно растущих культур) существенно облегчают анализ полученных данных и их оценку.

Выводы обоснованы большим объемом экспериментального материала. Положения по части научно-практической новизны результатов, в целом, верны, хотя, по мнению оппонента, следовало избрать более точные формулировки.

С одной стороны, диссертационная работа И.В. Кудряковой отражает преемственность многолетним и плодотворным исследованиям лаборатории биохимии клеточной поверхности микроорганизмов ИБФМ им Г.К. Скрыбина РАН. С другой стороны, диссертантом, как лично, так и в сотрудничестве с коллегами, получены приоритетные и важные результаты, сформулированные ниже.

1. Установлена локализация белка Л5 с протеолитической активностью в клеточной оболочке клеток продуцента – бактерии *Lysobacter* sp. XL1 и его секреция в виде везикул нанометрового (30-65 нм) размера.
2. Предложен новый механизм образования секреторных везикул в определенных участках клеточной оболочки с участием кардиолипина как основного липидного компонента везикулярных структур.
3. Осуществлена успешная экспрессия рекомбинатного белка Л5 клетками *Pseudomonas fluorescens* с его секрецией в виде везикул с такой же антимикробной активностью, как и у нативного продуцента - *Lysobacter* sp. XL1.
4. Доказано наличие эндопептидазной и амидазной активности у исследуемого белка в отношении пептидогликана стафилококков, что расширяет представления о функциональной роли литических протеаз, синтезируемых лизобактером.
5. Выявлены особенности пространственной структуры белка Л5 (наличие особых доменов, плотная упаковка, способность к образованию амилоидоподобных структур), важные не только для проявления функциональной активности, но и, по видимому, обеспечения стабильности.
6. Доказана необходимость липосомальной формы белка Л5 (или в ассоциации с экзополисахаридами) для проявления им антимикробного эффекта на патогенные бактерии (в том числе, множественно устойчивые штаммы золотистого стафилококка).

7. Созданы предпосылки для дальнейшей разработки антимикробных препаратов на основе белка Л5 для лечения стафилококковых инфекций.

Общая оценка диссертации

Диссертация И.В. Кудряковой оформлена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части с изложением методов и результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 360 ссылок (20 на отечественные и 340 на зарубежные публикации).

Обзор литературы составлен по материалам большого числа публикаций, в том числе, недавно вышедших, и состоит из 4 подглав. Следует особо подчеркнуть, что обзор дает исчерпывающее представление о структурных особенностях клеточных оболочек бактерий, о внеклеточных бактериолитических ферментах и особенно о недооцененных, структурах – внеклеточных везикулах: их структуре, механизмах образования и функциональном значении. Безусловным достоинством обзора является акцент на современных тенденциях, например, в классификации грамположительных и грамотрицательных бактерий на моно- и дидермы, в анализе различных механизмов, задействованных в образовании внешнемембранных везикул. В качестве пожелания к обзору следует отметить два момента. Во-первых, важно было бы привести подробную информацию о способности бактериолитических ферментов к разрушению устойчивых спор (стр. 37) – это крайне интересный аспект. Во-вторых, уместно было бы провести анализ опубликованных данных с акцентом на механизмах, обеспечивающих стабильность этих белков. Вне всякого сомнения, обзор вполне достоин для публикации после некоторой доработки и свидетельствует о владении диссертантом современным состоянием проблемы и эрудиции.

Задачи полностью соответствуют цели работы.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных методов и протоколов и отражает высокий уровень методического обеспечения исследований, проведенных диссертантом. При внимательном ознакомлении с методиками были выявлены некоторые погрешности, например «Везикулы удаляли центрифугированием» (п. 2.2.1) – а на самом деле клетки; «суспензии отмывали на центрифуге (с. 53)» или жаргонизмы «300 мкл условий раствора №42 (с. 50)». На это следовало обратить внимание, поскольку представленный материал весьма полезен для составления практических руководств для обучения навыкам выделения и анализа белков и липидов.

Экспериментальные данные подробно документированы в соответствующей главе и сведены в 8 таблицах и 23 рисунках. В целом, полученные данные обосновывают выводы и рекомендации, изложенные в диссертации. Автором проделан внушительный объем

по получению и характеристике везикул, выявлению белка Л5 в их составе, установлению его субстратной специфичности, получению препаратов белков в кристаллическом виде, широкомасштабному анализу антимикробной и пептидогликан-литической активности, конструировании препаратов для проверки лечебного действия в опытах на мышах. Полностью отражено участие коллег и базовых организаций в осуществлении электронно-микроскопических и рентгеноструктурных исследований, в проверке антимикробной активности в отношении особо опасных патогенов и в испытаниях потенциального лечебного эффекта.

Результаты обсуждены в отдельном разделе; суть заключений и выводов логично вытекают из представленного материала.

Библиография составлена весьма тщательно, по единообразному стилю.

Высок личный вклад И.В. Кудряковой на всех этапах работ, вплоть до опубликования полученных данных.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Несомненным достоинством диссертационного исследования является включение полученных данных в составе шести публикаций в престижных журналах, в том числе, в категории 1 и 2 квартилей. Работа прошла апробацию на конференциях и симпозиумах.

Значимость полученных результатов для науки и практики и рекомендации их использования

С фундаментальных позиций полученные И.В. Кудряковой результаты ценны для понимания механизмов секреции белков, в том числе, с важными свойствами; для расширения представлений о способах межклеточного взаимодействия (при участии везикул); и в целом - для развития физиологии и биохимии микроорганизмов. Основная практическая значимость результатов диссертационной работы И.В. Кудряковой состоит в создании основ для разработки антимикробных препаратов, эффективных в отношении патогенных бактерий, в том числе, множественно-устойчивых стафилококков.

Результаты диссертации (обзор и экспериментальные данные) целесообразны для включения в лекционные курсы студентов профильных кафедр Пущинского университета и других ВУЗов, а методическая часть – может послужить основой для разработки практикумов. Препараты на основе белков с бактериолитическими свойствами могут быть рекомендованы для проверки и дальнейших испытаний в уполномоченных организациях медицинского профиля.

Замечания и вопросы

При ознакомлении с диссертацией и анализе полученных данных возникли следующие замечания и вопросы дискуссионного характера.

Формулировка в выводе 1, что «бактериолитическая протеаза Л5 ... является фактором, обуславливающим биогенез везикул...» не является точной. Может создаться впечатление, что этот белок необходим для образования везикул вообще. Этого не прослеживается для нативного продуцента - штамма *Lysobacter* sp. XL1: он образует везикулы без этого белка. Другое дело, что доказана локализация и секреция белка в составе везикул определенного размера – так это и надо было сформулировать в этом выводе.

Важно было бы прояснить вопрос о возможности (или невозможности) секреции белка Л5 без участия везикул.

В части определения бактериолитической активности везикул рекомбинантного белка (стр. 66) не приведен сравнительный анализ эффективности действия разных препаратов.

Хотелось бы видеть соображения по поводу того, чем обусловлен отсроченный эффект (на 9 и 15 сут) после инъекции мышам препарата на основе Л5 и экзополисахарида, при его отсутствии на 5 сут? (Табл. 8).

Весьма спорно, что разница в поглощении 0.03 - 0.04 ед. относительно контроля, выявленная при проверке литического действия антимикробного препарата, достаточна для констатации значимого литического эффекта (с. 82-83).

В связи с активными исследованиями *Lysobacter* sp. XL1 и ссылками на него при описании других представителей этого рода, уместен вопрос: что известно по поводу филогенетического родства этого штамма с известными видами или он является представителем нового вида?

В тексте диссертации выявлены опечатки, стилистические погрешности, неточности, повторы, что было показано соискателю.

Высказанные замечания ни в коей мере не умаляют очевидных достоинств работы и высокого впечатления от существа исследования и качественного оформления.

Заключение

Диссертация Ирины Валерьевны Кудряковой, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной фундаментальной задачи по выявлению особенностей образования бактериями внеклеточных везикул с белком, обладающим ан-

тимикробным действием, что имеет существенное значение для биохимии микроорганизмов и разработки основ для создания эффективных медицинских препаратов.

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 изменением Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года №335.

Автор диссертации – И.В. Кудрякова, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Ведущий научный сотрудник
Института микробиологии
им. С.Н. Виноградского
Федерального государственного учреждения
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,
руководитель Центра коллективного пользования
«Коллекция микроорганизмов UNIQEM»

доктор биологических наук



Мулюкин

119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 4
Телефон: 8(901) 502-06-05. Факс: 8(495) 954-27-32

E-mail: andlm@mail.ru