

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

Диссертация Кудряковой И.В. представляет собой обширное исследование, посвященное изучению везикул, образованных внешними мембранами грамотрицательной бактерии *Lysobacter* sp. XL1. Внешнемембранные везикулы, будучи вовлечены в передачу биологических сигналов, являются медиаторами различных процессов: секреции белков, утилизации токсических метаболитов, получения питательных веществ, поэтому изучение их свойств является интересным и актуальным. Кроме того, патологическая роль везикул отмечена в ряде заболеваний, включая рак, нейродегенеративные нарушения, инфекционные болезни, что выдвигает на первый план потенциально новые направления для терапевтического применения. Недавно методами белковой инженерии и рационального дизайна впервые были получены искусственные генетически кодируемые внеклеточные везикулы, несущие белки, ферменты, нуклеиновые кислоты с поверхностью, близкой к таковой у других клеток, но управляемо модифицированной, например рецепторами или антигенами. Поэтому изучение биогенеза и свойств внешнемембранных везикул является актуальным и практически важным.

Целью данной работы было изучение особенностей топогенеза бактериолитических ферментов для биохимии клеточной поверхности микроорганизмов и секреции белков. Для этого было необходимо установить роль белка Л5, который является литической протеиназой, и фосфолипидов, установить пространственные структуры литических протеиназ Л1 и Л5, а также разработать подходы к созданию антимикробных препаратов на основе протеиназы Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Как видно из диссертации автор успешно справился с поставленными задачами. Оказалось, что штамм *Lysobacter* sp. XL1 образует два вида везикул, причем Л5 концентрируется с внутренней стороны внешней мембраны и формирует секреторные везикулы, содержащие Л5. Для получения литической протеиназы Л5 ранее была разработана экспрессионная система на основе *P. fluorescens* Q2-87. Заслугой диссертанта является установление факта, что рекомбинантный штамм *P. fluorescens* Q2-87 секретирует белок Л5 так же, как и *Lysobacter* sp. XL1, посредством везикул. Возможно, что и в рекомбинантной системе белок Л5 является участником биогенеза везикул. Как видно из таблицы, препарат везикул обладает сильным литическим действием в отношении грамположительных бактерий и более слабым в отношении

грамотрицательных бактерий. Также было установлено литическое действие препарата везикул Q2-87/B в отношении живых патогенных бактерий: метициллинустойчивого штамма *S. aureus* 55 (MRSA) и *B. anthracis* 71/12 (рис. 17 а, б). Установлено два фактора, обуславливающих биогенез везикул *Lysobacter* sp. XL1: литический фермент Л5 и кислый фосфолипид кардиолипин

Следует отметить успехи диссертанта в кристаллизации белков. Для кристаллизации использовали рекомбинантные протеиназы Л1 и Л5, полученные из телец включения *E. coli* BL21(DE3)/pLysE. В результате были получены активные, электрофоретически гомогенные белки Л1 и Л5, которые использовали для структурного анализа. Собраны рентгенодифракционные данные и определены структуры с разрешением 1,35 Å для белка Л1 и 1,60 Å для белка Л5. Сравнительная характеристика строения молекул белков Л1 и Л5 выявила их структурную идентичность с α -литической протеазой *L. enzymogenes*, которая составила 84% для белка Л1 и 60% для белка Л5. Между собой белки Л1 и Л5 идентичны на 63%, что дает возможность отнести протеиназы к семейству сериновых протеиназ S1 субклана PA(S). Результат определения литической активности по гидролизу пептидных связей в пептидогликане свидетельствует о гидролизе белком Л5 пептидных связей в межпептидном мостике (Gly-Gly эндопептидазная активность), а также амидной связи между N-ацетилмурамовой кислотой и первым L-Ala (N-ацетилмурамоил-L-Ala амидазная активность). Таким образом, белок Л5 *Lysobacter* sp. XL1, как и белок Л1, является не только протеазой, но и пептидогликангидролазой, проявляя эндопептидазную и амидазную активности по отношению к пептидогликану *S. aureus* 209P. Л5 обладает амидазной активностью по флюорогенному субстрату Abz-Ala-Ala-Phe-pNA.

Выделение гомогенных рекомбинантных литических протеиназ является несомненной заслугой автора, однако свойства их исследованы лишь частично. Для полной характеристики нужно провести ингибиторный анализ, установить pH- и T- оптимумы действия, исследовать условия стабильности. Необходимо сравнить свойства с литературными данными для похожих ферментов. Это особенно важно в том случае, если автор продолжит разработку лечебных препаратов, полученных на основе Л5.

Представленная работа отличается четкостью поставленных задач и тщательностью их исполнения с применением многочисленных современных методов биохимии. Выводы обоснованы и логично вытекают из результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 6 работ в ведущих российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ, трудах международных и всероссийских конференций, в 9 тезисах докладов.

Диссертация и автореферат хорошо оформлены, содержат необходимые иллюстрации и рисунки.

Актуальность и объем проведенных исследований, а также новизна и достоверность полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание кандидатской степени в п. 9 « Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ № 842 от 24.09.2013 г. Диссертация Кудряковой является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для развития исследований в области биогенеза везикул, а автор диссертационной работы Кудрякова Ирина Валерьевна безусловно заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности биохимия. 03.01.04..

Ведущий научный сотрудник кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ, доктор химических наук, профессор

 Г.Н.Руденская

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
Телефон: 8(495) 939-16-71. Факс: 8(495) 932-88-46

01 июня 2017 г.

e-mail: labortoriahps@hotmail.com

