

Отзыв

на автореферат диссертации Кудряковой Ирины Валерьевны «Биогенез везикул *Lysobacter* sp. XL1, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия

Учитывая важную роль везикул в разнообразных биологических процессах, актуальность диссертационной работы Кудряковой И.В., посвященной исследованию биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1, сомнений не вызывает.

Так как ранее было показано, что везикулы, содержащие белок Л5, эффективно лизируют широкий спектр микроорганизмов, включая патогенные штаммы, изучение везикул *Lysobacter* sp. XL1 имеет важное биомедицинское значение.

Целью представленной диссертационной работы являлось исследование роли белка Л5 и фосфолипидов внешних мембран в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1. Для этого диссертанту необходимо было установить роль фосфолипидов и белка Л5 в биогенезе секреторных везикул *Lysobacter* sp. XL1; определить пространственные структуры гомологичных белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 и провести их анализ; определить тип гидролизующих связей белком Л5 *Lysobacter* sp. XL1 в пептидогликане стафилококка и показать возможность создания антимикробных препаратов на основе этого белка.

В первой части работы диссертантом исследованы факторы биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1. Разделением везикул в градиенте плотности сахарозы получено 4 фракции. Методом электронной микроскопии было установлено, что во всех фракциях содержатся гетерогенные как по размеру и плотности, так и белковому составу везикулы. Иммуноблоттингом показано, что белок Л5 обнаруживается лишь во фракции 1.

Иммуноцитохимическими исследованиями колоний клеток *Lysobacter* sp. XL1 установлено, что белок Л5 концентрируется в локусах периплазмы, прилегающих к внутренней стороне внешней мембраны, из которых в дальнейшем и формируются секреторные везикулы. Полученные данные указывают на участие белка Л5 в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1. Дополнительные доказательства участия белка Л5 в везикулообразовании были получены при сравнительном исследовании природного штамма *P. fluorescens* Q2-87 и его рекомбинантного варианта - *P. fluorescens* Q2-87/B, продуцирующего рекомбинантный белок Л5.

Далее была исследована роль фосфолипидов в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1. Для решения этой задачи методом двумерной тонкослойной

хроматографии была проведена сравнительная характеристика фосфолипидного состава препаратов внешних мембран и везикул, в котором был обнаружен лишь один мажорный фосфолипид - кардиолипин.

Таким образом, диссертантом установлено два фактора, участвующих в биогенезе везикул *Lysobacter* sp. XL1, – секретируемый белок Л5 и фосфолипид кардиолипин. На основании полученных данных предложена собственная модель биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1.

Вторая часть диссертационной работы Кудряковой И.В. посвящена структурно-функциональной характеристике белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1.

Для этого были получены кристаллы белков Л1 и Л5 *Lysobacter* sp. XL1 и исследованы их пространственные структуры. Показано, что белок Л5 имеет более плотную кристаллическую упаковку, причем половина молекул имеют разрыв в петле на участке между 172 и 182 а.о. и наблюдаются существенные отличия в эквивалентных петлях гомологов.

Далее было показано, что белок Л5 может образовывать агрегаты в виде амилоидов. Это явление, впервые обнаруженное диссертантом для бактериальных литических ферментов, по-видимому, позволяет объяснить отсутствие собственного гидролиза пептидогликана в процессе топогенеза белка Л5.

Изучение специфичности литической протеазы Л5 проведено с использованием в качестве субстрата пептидогликан *S. aureus* 209P. Показано, что фермент обладает эндопептидазной активностью, расщепляя связи Gly–Gly и амидазной активностью (расщепление связи между N–ацетилмуравовой кислотой и первым L–Ala, гидролиз пептидного субстрата).

В заключительной части работы была исследована литическая активность и лечебное действие антимикробных препаратов на основе белка Л5 *Lysobacter* sp. XL1. Полученные препараты обладали выраженным литическим действием по отношению к живым клеткам штаммов *Staphylococcus* и *Bacillus*. На модели стафилококкового сепсиса беспородных белых мышей был продемонстрирован лечебный эффект препарата, полученного на основе экзополисахарида и белка Л5. Эти результаты, безусловно, имеют научно-практическое значение.

К замечанию я отнес бы не очень четкое изложение материала в разделе определения специфичности протеазы Л5. Почему утверждается, что гидролиз происходит только по связи Gly–Gly. В то же время не наблюдается ли гидролиз по связям X–Gly, где X любая аминокислота? Методом динитрофенилирования

определяется лишь N-концевая кислота в месте разрыва пептидной связи, но не C-концевая.

Сделанное замечание ни в коей мере не снижает высокого качества представленной диссертационной работы. Научная новизна и практическая ценность работы подтверждается хорошими публикациями в зарубежных журналах и выступлениями автора на престижных конференциях.

В целом диссертационная работа Кудряковой Ирины Валерьевны «Биогенез везикул *Lysobacter* sp. XL1», посвященная исследованию современных факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1, структурно-функциональной характеристике изучаемых белков на основе сравнительного анализа их пространственных структур, а также возможному использованию полученных результатов работы в практической медицине, полностью соответствует 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, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Зав. лабораторией химии протеолитических ферментов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
д.х.н., профессор

Л.Д. Румш

ПОДПИСЬ
ДОСТОВЕРНО
ЗАВ. КАНЦЕЛЯРИЕЙ
"23" мая 2017



« 23 » мая 2017 г.

Адрес организации: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10. Тел.: +7 (495) 335-01-00. E-mail: lev.rumsh@ibch.ru