

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Каратовской Анны Петровны «**Иммунохимическое исследование литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Диссертационная работа А.П. Каратовской, представленная на защиту, посвящена разработке методов иммунохимического определения эндопептидаз AlpA и AlpB в препаратах *Lysobacter* sp. XL1. Литические ферменты AlpA и AlpB *Lysobacter* sp. XL1 входят в состав антимикробного препарата лизоамидаза, получаемого из культуральной жидкости бактерии. Демонстрируя различный спектр антимикробной активности, AlpA и AlpB гидролизуют пептидогликан клеточной стенки микроба – мишени. Ферменты AlpA и AlpB относятся к сериновым протеазам и синтезируются в виде предшественников. Аминокислотные последовательности PreAlpA и PreAlpB состоят из последовательностей сигнальных пептидов, N-концевых пропептидов и зрелых частей, которые превращаются в активные формы в процессе созревания и секреции. Сигнальный пептид обеспечивает транслокацию синтезированной полипептидной цепи через цитоплазматическую мембрану в периплазму. Пропептид в составе предшественника удерживает зрелую часть в неактивном состоянии. В результате отщепления пропептида формируется протеолитически активная пространственная структура зрелой части. Секреция AlpA и AlpB в культуральную среду, по-видимому, осуществляется по-разному. Работа А.П. Каратовской посвящена выяснению некоторых особенностей созревания эндопептидаз AlpA и AlpB. Для селективной идентификации различных форм эндопептидаз диссертантом были получены высокоспецифичные мышинные моноклональные антитела и сконструированы прототипные тест-системы пригодные для измерения концентрации эндопептидаз AlpA и AlpB в культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1, клеточных фракциях бактерии, и в препарате лизоамилаза. Работа имеет прикладное значение, поскольку разработанные А.П. Каратовской методы количественного определения зрелых форм литических ферментов AlpA и AlpB могут быть использованы при разработке новых антимикробных препаратов, не приводящих к появлению резистентности.

В диссертационной работе А.П. Каратовской были использованы разнообразные современные биохимические и иммунохимические методы – гибридомный метод получения мышинных моноклональных антител, иммуноферментный анализ в непрямом и «сэндвич»-вариантах, иммуноблоттинг, аффинная хроматография, электрофорез, культивирование бактерий.

Совокупность полученных экспериментальных результатов позволяет оценить работу А.П. Каратовской как законченный научный труд с обоснованными выводами.

Диссертация А.П. Каратовской построена по традиционному плану. Она включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы (305 ссылок на литературные источники). Работа изложена на 121 странице, содержит 26 рисунков и 9 таблиц.

В разделе «Введение» диссертант обосновывает актуальность и значимость проведения исследований, явившихся предметом представленной работы, определяет цели и задачи исследований, а также положения, выносимые на защиту.

Раздел «Обзор литературы» изложен на 33 страницах и состоит из двух разделов. В первом разделе автор приводит общие сведения о технологии получения моноклональных антител, их свойствах, а также применении моноклональных антител в медицине и биотехнологии. Во втором разделе автор рассказывает о бактерии *Lysobacter* sp XL1 и секретируемых ей литических ферментах, особо отмечая научно-практическое значение получаемого из *Lysobacter* sp XL1 антимикробного препарата лизоамидаза. В целом обзор литературы написан хорошим языком, содержит достаточный фактический материал и хорошо подготавливает читателя к восприятию основной части диссертационной работы. В то же время, хотя автор и упоминает важность получения антимикробных препаратов, не приводящих к возникновению привыкания патогенов, в обзоре литературы явление резистентности патогенных микроорганизмов не обсуждается.

Раздел «Материалы и методы» изложен на 13 страницах и содержит достаточно полное изложение использованных методик, которые могут быть воспроизведены по приведенным описаниям. Применение разнообразных

иммунохимических и биохимических методов позволило диссертанту успешно решить поставленные задачи.

Раздел «Результаты и обсуждение» изложен на 33 страницах и состоит из 5 частей. В первой части автор описывает получение и характеризацию моноклональных антител к пропептидам и зрелым формам AlpA и AlpB. Использование автором пептидных и белковых иммуногенов и разных схем иммунизации лабораторных животных привело к успешному получению неперекрестных антител, специфичных к AlpA и AlpB и их пропептидам. Во второй части диссертант описывает разработку тест-систем для количественного определения эндопептидаз AlpA и AlpB in-vitro. Используя панель антител, полученных на первом этапе работы, диссертанту удалось создание специфичных тест-систем на основе иммуноферментного анализа «сэндвич»-типа, достаточно чувствительных для выполнения поставленных в работе задач. В третьей и четвертой частях работы автор изучает топографию молекулярных форм эндопептидаз AlpA и AlpB в культуральной жидкости и клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1 используя созданные тест системы, а также метод иммуноблоттинга. Полученные автором данные позволяют сделать некоторые выводы относительно механизма секреции ферментов AlpA и AlpB в окружающую среду. Фермент AlpB накапливается в периплазматическом пространстве, в то время как эндопептидаза AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазме. В заключительной, пятой части диссертационной работы автором продемонстрирована принципиальная возможность использования разработанных тест-систем для стандартизации количества ферментов AlpA и AlpB в антимикробном препарате лизоамидаза.

Четыре вывода работы полностью соответствуют поставленным в начале работы задачам и позволяют считать основную цель работы достигнутой.

По теме диссертации автором опубликованы 3 статьи в рецензируемых журналах. Апробация работы проведена в виде 8 сообщений на российских научных конференциях. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы А.П. Каратовской полностью отражают содержание диссертации.

Прочтение данной диссертационной работы оставляет в целом благоприятное впечатление, однако она не свободна от некоторых недостатков. В частности,

- Автор пишет, что эпитоп для одного из антител, использованных в тест системе для определения AlpV, доступен лишь при денатурации белка (стр. 79), в силу чего данная тест система способна определять AlpV только в денатурированной форме. При определении содержания AlpV в культуральной жидкости *Lysobacter* sp. XL1 образец жидкости подвергали денатурации щелочью с последующей нейтрализацией. Данные, приведенные на рисунке 24 Б, свидетельствуют, что нормализованная на плотность культуры концентрация AlpV значительно превосходит уровень литической активности в пробе (биологические эксперименты после 12 часов культивирования). В работе не приведено убедительного объяснения данному факту, хотя причиной может быть присутствие части зрелой формы AlpV в неактивном состоянии.

- В разделе «Материалы и методы» при описании условий центрифугирования автор упоминает такой параметр, как об/мин (например, стр.48 и стр.51), в то время как для успешного воспроизведения методики читателю необходимо знать относительное центробежное ускорение (relative centrifugal force, g).

Заключение

Высказанные замечания и комментарии ни в коей мере не уменьшают безусловных достоинств представленной диссертационной работы. По своему объему, оформлению и качеству полученных данных, диссертационная работа А.П. Каратовской отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Кандидат биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия,
научный сотрудник Проблемной лаборатории «Химия ферментов» кафедры
биоорганической химии
Биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»,
Адрес: 19991, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1,
стр. 12, Биологический факультет МГУ.
Тел.: +79859232248
Email: vladlf04@gmail.com
Филатов Владимир Львович

22 января 2019 года



Подпись к.б.н. В.Л.Филатова заверяю
Декан Биологического факультета МГУ, академик
М.П. Кирпичников

