

Отзыв

официального оппонента Солонина Александра Сергеевича на диссертационную работу Каратовской Анны Петровны «Иммунохимическое исследование литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1» по специальности 03.01.04 «Биохимия»

Актуальность темы исследования.

Научно-квалификационная работа (диссертация) аспиранта Каратовской Анны Петровны посвящена изучению топографии молекулярных форм литических белков AlpA и AlpB и их секреции в окружающую среду. AlpA и AlpB относятся к сериновым протеазам и синтезируются в виде предшественников, однако, некоторые вопросы: такие как где и когда происходит полное расщепление пропептидов исследуемых ферментов, где происходит окончательное созревание функционально активных форм – в периплазме или в процессе транслокации через внешнюю мембрану не были до сих пор решены. Использование моноклональных антител, в качестве специфичного инструмента исследования, направленным на различающиеся участки этих близких по структуре гомологичных белков, позволяют приблизиться к решению этих вопросов. Работа, представляемая Анной Петровной вне всяких сомнений, является актуальной, так как иммунохимическое изучение топографии молекулярных форм в частности литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1, позволит приблизиться к пониманию особенностей их секреции. В настоящей работе осуществлено комплексное исследование различных форм этих ферментов с использованием разнообразного арсенала иммунохимических подходов. Таким образом, актуальность проведения иммунохимических исследований топографии секреторных бактериальных белков для понимания основных механизмов и путей секреции не вызывает сомнения. Результаты работы могут иметь и прикладное значение при разработке новых антимикробных препаратов, включенных в антивирулентную терапию и не приводящих к появлению резистентности, на основе секретируемых литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Полученные в диссертационной работе результаты и сформулированные выводы полностью соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Достоверность полученных результатов определяется применением современных молекулярно-генетических методов исследования и обеспечивается выполненными наблюдениями, проиллюстрированными множественным фактическим материалом - 22 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 301 источник отечественной и зарубежной литературы. Основные результаты работы опубликованы в печатных работах, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в мировые базы цитирования. Непосредственно по материалам представляемой работы автором опубликовано 3 экспериментальные статьи. Результаты диссертационной работы были представлены на 8 всероссийских и международных конференциях.

Научная новизна.

В результате проделанной работы автором получены представительные коллекции гибридных клеток – продуцентов МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1. Продемонстрирована высокая аффинность и специфичность (отсутствие иммуноперекрестной реактивности), что позволило эффективно использовать МА в качестве инструмента для иммунохимического исследования эндопептидаз AlpA и AlpB. Разработаны высокочувствительные тест-системы в формате «сэндвич» – ИФА на основе МА для количественного определения молекулярных форм литических эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1. Кроме того, количественное определение содержания молекулярных форм AlpA и AlpB «сэндвич»-ИФА и их детекция иммуноблоттингом в клеточных фракциях *Lysobacter* sp. XL1 показали, что AlpA секретируется, не задерживаясь в периплазматическом пространстве, в то время как белок AlpB накапливается в периплазматическом

пространстве. Таким образом, впервые метод «сэндвич»–ИФА использован для количественной оценки содержания ферментов AlpA и AlpB и их молекулярных форм в различных компартментах клетки. Полученные данные позволяют существенно обогатить наши знания о природе и механизмах секреции экзо ферментов бактериальных клеток.

Научно-практическая значимость работы.

Описанные в данной работе иммунохимические подходы являются общими при исследовании секретируемых белков бактериальных клеток. С помощью разработанных тест-систем на основе МА возможны стандартизация и проведение контроля качества антимикробных препаратов на основе ферментов, секретируемых бактериями и препаратов, разрабатываемых в настоящее время с использованием рекомбинантных штаммов–продуцентов. В данной работе впервые использован метод «сэндвич» –ИФА для количественной оценки содержания ферментов AlpA и AlpB и их молекулярных форм в различных компартментах клетки.

Структура диссертационной работы.

Диссертационная работа Каратовской А. П. изложена на 121 страницах компьютерного текста, построена по традиционному плану и включает в себя введение, обзор литературы, методология и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, а также заключение, выводы, список сокращений и аббревиатуры, список литературы. Текст диссертации начинается с «Введения», в котором обосновывается актуальность темы исследования, степень её разработанности, указаны цели исследования и поставлены соответствующие задачи. Во «Введении» также обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования. В этом разделе диссертации указаны также положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, личный вклад соискателя, публикации, соответствие специальности, а также структура диссертации. Интересно написан обзор литературы. В нем изложены современные представления о гибридной технологии, о свойствах моноклональных антител, определивших их широкое применение в лекарственных препаратах, а также описание примеров использования МА в терапевтических целях и в диагностике. В обзоре также рассмотрены вопросы использования МА в качестве инструмента исследования в фундаментальной науке. Отдельная глава обзора посвящена изучению и характеристике сериновых эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1. Из обзора литературы логично следуют цель и задачи работы. Несмотря на относительно небольшой объем представленного материала все изложенное непосредственно связано темой диссертации отражает современное состояние проблемы и помогает лучше понять значимость полученных автором диссертации результатов. Обзор написан очень грамотно, отражает хорошее владение диссертанта материалом и дает четкое представление о состоянии изучаемой проблемы, что свидетельствует об отличном знании и глубокой проработке автором литературных источников и его научной эрудиции.

Работа Каратовской А. П. выполнена на высоком методическом уровне с использованием комплекса современных методов биохимии, иммунологии и молекулярной биологии, адекватных поставленным задачам. Экспериментальные методы изложены детально, их можно воспроизвести.

В третьей главе доложены результаты работы и их обсуждение. Экспериментальная часть хорошо проиллюстрирована, содержит много рисунков и таблиц, помогающих восприятию полученных данных. В этой главе автор сопоставляет полученные результаты с имеющимися литературными данными. Научные положения, сделанные автором, хорошо аргументированы и обоснованы большим количеством экспериментального материала. Следует отметить, что эта глава написана корректно и содержит ссылки на источники литературы. В этом разделе приведено описание получения стабильных гибридных клонов–продуцентов МА к пропептидам и зрелым формам эндопептидаз AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1, детально описана разработка методов количественного определения пропептидов и зрелых форм этих белков, разработаны и удачно применены аналитические методы для количественной оценки содержания пропептидов и зрелых форм этих ферментов в культуральных жидкостях, клеточных фракциях и в препаратах лизомидазы. Достоверность результатов не вызывает сомнений. Выводы диссертации обоснованы и полностью соответствуют целям, задачам работы и полученным результатам. Результаты могут быть интересны для специалистов и найти практическое применение в профильных лабораториях,

а также на биологических кафедрах высших учебных заведений. Представленная диссертационная работа доступно и достаточно грамотно изложена. Автореферат диссертационной работы Каратовской А. П. в полной мере отражает основные результаты и выдвигаемые на их основе положения и соответствует всем требованиям, а материал работы соответствует заявленной специальности.

Говоря о стиле написания всей работы: она написана четким, лаконичным языком, хотя не лишена "жаргонных" (лабораторных) выражений и опечатков. Это иногда затрудняет чтение работы, но указанные замечания ни в коей мере не влияют на положительную оценку диссертации и высокий интерес к представленным результатам, которые, являются актуальными для таких отраслей науки как промышленная микробиология, биохимия и биотехнология.

Заключение.

Диссертация 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 является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным на высоком научном и методическом уровне. Достоверность результатов не вызывает сомнений. Выводы диссертации обоснованы, автореферат полностью отражает ее основное содержание. По актуальности целей и задач проведенного исследования, адекватности методов для их решения, теоретической и практической значимости полученных результатов и сделанных на их основе выводов диссертационная работа Каратовской А. П. соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335), а ее автор Каратовская Анна Петровна, безусловно заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия». Результаты и выводы данной диссертации могут быть успешно использованы в научных исследованиях в области биотехнологии иммунологии и биохимии. Возможно применение результатов не только в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, где выполнялась работа, но и в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, в Институте биофизики клетки РАН, Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институте белка РАН, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Московском государственном университете им М.В. Ломоносова, а также во многих других центрах по изучению биохимии секреторных белков России и зарубежья.

Официальный оппонент



Солонин Александр Сергеевич

Заведующий лабораторией молекулярной
микробиологии ФГБУН Института биохимии и
физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
РАН, д.б.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им Г. К. Скрыбина РАН Адрес: 142290 г. Пущино, Московской области, пр. Науки, д. 5.

Телефон: +7 (495) 956-33-70 E-mail оппонента: solonin@ibpm.pushchino.ru,

Сайт института: [http:// www.ibpm.ru](http://www.ibpm.ru)

Согласен на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета Д002.247.01 по диссертационной работе Каратовской Анны Петровны «Иммунохимическое исследование литических ферментов AlpA и AlpB, секретируемых *Lysobacter* sp. XL1», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Удостоверен секретарь  *Солонин Александр Сергеевич* № 3
Боксерова РИ