

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Курдюмова Алексея Сергеевича «Получение и свойства рекомбинантной дестабилазы – полифункционального фермента медицинской пиявки», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

Тромбоз сосудов системы кровотока является в настоящее время одной из наиболее распространенных причин смертности пациентов. При этом заболевании происходит прижизненное образование в кровеносных сосудах сгустков крови, основу природы которых составляют тромбоциты и фибрин. Как правило, такие явления инициируются, во многом, повреждением эндотелия сосуда и попыткой организма предотвратить потерю крови образованием в месте повреждения тромба. Однако такого рода сгустки крови могут образовываться и в отсутствие повреждений сосуда. При наличии в районе тромбоза бактериальной инфекции или даже в ее отсутствие тромб может подвергнуться частичному разрушению, что приводит к образованию его осколков (эмбол) и их переносу в практически любое место организма, где они накапливаются, что и приводит к обширной септической эмболии. Попадая и задерживаясь в достаточно малом сосуде (например, коронарной артерии), эмбол может привести к окклюзии и резкому снижению питания кардиомиоцитов кислородом, что, в свою очередь, формирует инфаркт миокарда.

В норме, большинство тромбов разрушается в процессе фибринолиза, что, в конечном итоге, восстанавливает проходимость сосуда, возвращая кровоток практически к норме. Однако, в случае острой окклюзии сосудов тромботической природы (например, при развитии инфаркта миокарда) показано применение срочной терапии (иногда в течение нескольких часов), т.к. промедление в этом случае ведет не только к некрозу участка сердечной мышцы, но и значительному затруднению в разрушении самого тромба (формирование фибрина высокой стабилизации).

Т.о. в тромбообразовании важную роль играют следующие факторы: повреждение эндотелия стенок сосудов (практически любого генезиса: постановка стентов, катетеров, механическая и постоперационная травма, венозное протезирование, эндотоксины и т.д.), нарушение кровотока (варикозное расширение сосудов), угнетенное состояние фибринолиза и гиперкоагуляция (может быть обусловлено генетически). В связи с этим, тромболитическую терапию можно условно разделить на два подхода: профилактический (применение дезагрегатной, антикоагулянтной, спазмолитической, метаболической терапии, а также физиолечение) и тромболечение, основанное на применении прямого воздействия (как правило, лизис) на фибриновый тромб.

Рождением практической тромболитической терапии с полным основанием можно считать 1976г., когда в научной литературе появилась статья Е.И.Чазова, посвященная внутрикоронарному лизису тромба с использованием стрептазы. За прошедшее после этого время в практической медицине появились новые высокоэффективные

тромболистики белковой природы: вышеупомянутая стрептокиназа (аналоги: авелизин, стрептаза, целиаза), фибринспецифичный фермент – тканевый активатор плазминогена (алтеплаза), про- и урокиназа, пуролаза, гемаза, метализе, стафилокиназа и др. Следует отметить, что применение этих препаратов довольно специфично и, как правило, требует особого внимания со стороны медицинского персонала, т.к. они часто вызывают целый ряд побочных эффектов: системные кровотечения, резкое падение артериального давления, аллергические реакции. Важно также, что ряд этих препаратов является иммуногенными и повторное их использование при возникновении у пациента реоклюзии представляет особую сложность. Немаловажно также отметить относительно высокую стоимость ряда из вышеуказанных препаратов, что в немалой степени ограничивает их широкомасштабное применение в практической медицине.

В связи с этим, можно отметить, что поставленная в диссертационной работе задача по получению, исследованию свойств и разработке, в конечном итоге, нового отечественного полифункционального тромболитического препарата на основе рекомбинантной дестабилазы из пиявки, обладающего принципиально новым механизмом гидролиза фибриновых тромбов (эндо-ε-(γ-Glu)-Lys-изопептидазная активность), мурамидазной и антимикробной активностью (блокирует рост микроорганизмов), безусловно, является актуальной и своевременной.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Автор диссертационной работы впервые сконструировал экспрессионные плазмиды и на основе клеток *E. coli* получил рекомбинантные штаммы-продуценты всех известных к настоящему времени изоформ дестабилазы – Dest1, Dest2 и Dest3. Проведенные исследования свойств вышеуказанных изоформ позволили Курдюмову А.С. сосредоточить свое внимание на Dest2 изоформе дестабилазы и впервые получить ее рекомбинантную форму в эукариотических системах экспрессии: в клетках дрожжей (*P. pastoris*) и культуре эмбриональных клеток почек человека (Expi293F). При этом автор показал, что целевой белок эффективно секретировался в культуральную жидкость в обоих случаях. Этот факт является немаловажным, т.к. существенно упрощает систему выделения и очистки Dest2. В ходе выполнения экспериментальной части диссертационной работы автор подробно исследовал изопептидазную, мурамидазную, фибринолитическую и антимикробную активности полученных дестабилаз. При этом впервые было показано влияние значения pH и ионной силы растворов среды на мурамидазную и изопептидазную активность полученных рекомбинантных белков. Эти показатели являются крайне важными и являются во многом стартовыми при разработке тромболитического препарата нового поколения.

Очень любопытными являются результаты исследования антимикробной активности как самих изоформ дестабилазы, так и их триптических гидролизатов (Dest-t), где автор впервые показал наличие этой активности по отношению к клеткам грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных бактерий (*Bacillus subtilis*). Этот факт во многом усиливает интерес к исследуемому белку, т.к. патологический тромбоз часто проявляется на фоне инфицирования организма пациента и может сопровождаться

формированием нежелательных дополнительных воспалительных очагов, вызванных патогенными бактериями.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Практическая значимость рецензируемой диссертации определяется, прежде всего, достигнутыми в ходе проведения экспериментов результатами. Прежде чем обозначить эти достижения следует отметить, что автору пришлось столкнуться с довольно трудной задачей – получить дестабилазу, максимально приближенную к природному белку, выделенному из пиявки медицинской. Основная трудность заключалась в высоком содержании остатков цистеина в этом белке (14 аминокислотных остатков из 115, которые формируют, предположительно, 7 дисульфидных связей). Из практики получения такого рода рекомбинантных белков известно, что их микробиологический синтез часто приводит к образованию неправильных как внутри- так межмолекулярных S–S связей, что приводит к получению нерастворимых и, чаще всего неактивных, форм целевого белка. Тем не менее, путем достаточно обширного набора экспериментов, автору удалось преодолеть вышеуказанные трудности. Из полученных Курдюмовым А.С. практически важных результатов можно особо выделить следующие:

1. сконструирована серия экспрессионных плазмид, содержащих структурную часть гена дестабилазы (и различных ее изоформ) под контролем различных промоторов. С использованием этих плазмид и клеток *E. coli* были получены штаммы-продуценты рекомбинантных дестабилаз;
2. детально была разработана и оптимизирована схема культивирования клеток *E. coli* рекомбинантного штамма-продуцента рекомбинантной дестабилазы-2, в том числе и в виде слитого белка с шапероном SlyD. Подробно описан подход к выделению, очистке и рефолдингу целевого белка;
3. в своей работе автор подробно исследовал и сравнил возможности получения рекомбинантной формы дестабилазы в различных клетках: прокариотах, грибах и млекопитающих. Автор показал, что наиболее подходящими для получения рекомбинантной дестабилазы являются клетки млекопитающих (клетки почек человека – Expi293F);
4. все эти полученные результаты формируют надежную основу для полноценного исследования полифункционального фермента (дестабилаза), детальному пониманию природы формирования этого свойства у дестабилазы. Наконец, очень важным практическим результатом рецензируемой работы является создание способа получения дестабилазы в препаративных количествах для проведения доклинических и, возможно, клинических испытаний дестабилазы в качестве нового тромболитического средства.

В заключение этой части отзыва хотелось бы отметить, что автор очень подробно привел все полученные экспериментальные данные (в том числе и не самые удачные) по разработке подхода к получению рекомбинантной дестабилазы. Этот факт является самостоятельной практической ценностью, т.к. дает возможность последующим исследователям более четко планировать аналогичные разработки, опираясь на ценный экспериментальный опыт, приведенный в рецензируемой диссертационной работе.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертационная работа Курдюмова А.С. построена по традиционной схеме и состоит из Введения (стр. 8 – 13), Обзора литературы (стр.14 – 44), Материалов и методов (стр.45 – 71), Результатов (стр. 72 – 129), Обсуждения результатов (стр. 130 – 138), Заключение (стр. 139 – 140) и Выводов (стр.141). В целом, диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста, содержит 49 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 147 источников.

В разделе «Введение» автор четко определил как цель всего исследования, так и задачи, решение которых во многом могли способствовать достижению основной этой цели – получению и изучению ферментативных и антибактериальных свойств рекомбинантных дестабилаз медицинской пиявки.

Глава «Обзор литературы» логично предваряет описание проведенных в диссертационной работе экспериментов и состоит из двух основных подразделов: рассмотрению механизмов формирования тромбов и их роль в поддержании гемостаза. Курдюмов А.С. проанализировал принципы лечения тромбозов, включая природу применяемых при этом тромболитических препаратов. Учитывая главное направление своего исследования, диссертант уделил особое внимание гирудотерапии и действию секрета слюнных желёз медицинской пиявки (ССЖМП) на компоненты гемостаза. В этом ряду, во второй части литературного обзора автор подробно описал дестабилазу из медицинской пиявки, включая историю ее открытия и получения рекомбинантной дестабилазы, принципов, в том числе и предполагаемых, формирования ее изопептидазной, лизоцимной и антимикробной активностей. Подробно рассмотрены особенности строения активного центра дестабилазы.

Следует отметить, что «Обзор литературы» рецензируемой диссертационной работы составлен с использованием самых современных источников. При этом автору удалось творчески переработать изобилие медицинских аспектов, включая и гирудотерапию, избежать множественного их цитирования, сосредоточив свое внимание только на самых важных аспектах предполагаемого исследования. Именно этот подход позволил Курдюмову А.С. сделать из сформированного литературного обзора вполне логичные выводы о необходимости исследования одного из компонентов ССЖМП – дестабилазы – как полифункционального белка, имеющего высокий потенциал для разработки нового типа (изопептидазная активность) тромболитического средства (стр. 44 диссертационной работы).

В разделе «Материалы и методы» автор подробно дал описание практически всех примененных в работе экспериментальных подходов: конструирование экспрессионных плазмид, получение рекомбинантных штаммов-продуцентов на основе клеток прокариот (*E.coli*), дрожжей (*P. pastoris*) и клеток почки эмбриона человека линии (Expi293F), оптимизация культивирования соответствующих продуцентов, выделение и очистка рекомбинантных дестабилаз, получение основных характеристик этих белков (изопептидазная, мурамидазная, фибринолитическая и антимикробная активности), изучение физико-химических характеристик полученных белков (электрофоретические и спектральные (КД), масс-спектрометрический и гель-фильтрационный анализ). Все

экспериментальные данные получены с применением современного аппаратного оформления и в достаточных повторностях, численные значения подвергались статистическому анализу и их достоверность не вызывает сомнений. Описание проведенных экспериментов приведено достаточно подробно (в ряде случаев даже избыточно) и они могут быть, при необходимости, легко воспроизведены.

Основные разделы диссертационной работы – «Результаты» и «Обсуждение результатов», в которых автор приводит полученные в ходе экспериментов данные и дает их сравнительную характеристику с опубликованными в научной литературе. Прежде чем приступить к анализу полученных Курдюмовым А.С. результатов, хотелось бы отметить, что, судя по стилю изложения, автор изначально хорошо осознавал, что, с учетом структурной сложности дестабилазы (большое количество дисульфидных связей), из основных существующих в настоящее время систем синтеза рекомбинантных белков: клетки бактерий, дрожжей и клеточные линии высших организмов, наиболее предпочтительными окажутся две последних. Это свидетельствует о достаточно хорошем знании и тщательном предварительном анализе существующих в научной литературе результативных подходов получения рекомбинантных белков.

Однако, с учетом того, что ранее рекомбинантная дестабилаза была получена с использованием клеток кишечной палочки, автор принял решение до конца исследовать потенциал именно этого варианта микробиологического синтеза данного белка. С этой целью Курдюмов А.С. получил, прежде всего, различные варианты экспрессионных плазмид (13 образцов), в которых структурная часть гена дестабилазы 2 находилась под контролем различных по своим свойствам промоторных областей (поздних генов бактериофага T7, промотор-операторная область гена уридинфосфорилазы *E.coli* (Pudp) и промоторной области арабинозного оперона *E.coli* (araB)). В литературе были уже описаны попытки конструирования эффективных штаммов-продуцентов дестабилазы и ее изоформ на основе клеток *E.coli* (Завалова Л.Л. и соавт., 2004г.) и было показано, что растворимая форма белка может быть получена в виде слитого с тиоредоксином гибридного белка. Последующее расщепление слитого белка и приводило к образованию рекомбинантной дестабилазы. Аналогичное исследование, проведенное авторами вышеупомянутой работы (Завалова Л.Л. и соавт., 2010г.), позволило получить дестабилазу 2 в виде нерастворимого белка (тельца включения), очистка которого с последующим рефолдингом привело к созданию штамма-продуцента активного рекомбинантного целевого белка с очень низким выходом (до 5мг/л). Т.о., формируя и учитывая полученные другими коллегами результатами начальный этап своего исследования, Курдюмов А.С. использовал ген дестабилазы 2 как своеобразный «модельный» вариант для получения рекомбинантного белка.

Одним из подходов, направленных на повышение эффективности микробиологического синтеза рекомбинантных белков является оптимизация кодонного состава целевого гена с учетом природы штамма-реципиента. Следует отметить, что данный подход не всегда является очевидно необходимым, т.к. часто рекомбинантные белки достаточно хорошо накапливаются в клетках реципиентного штамма при гетерологичной экспрессии соответствующего гена и без проведения оптимизации кодонного состава. Тем не менее, для выявления влияния кодонного состава структурной

части гена на эффективность трансляции Курдюмов А.С. с использованием химического синтеза олигонуклеотидов с последующей PCR-достройкой получил такой фрагмент ДНК и, на основе его, сконструировал соответствующие экспрессионные плазмиды (табл. 3, стр.73). Одновременно было запланировано введение поли-His последовательности, что, в случае успешной экспрессии соответствующего гена, потенциально позволяло автору проводить выделение и очистку целевого белка с применением аффинной металл-хелатной хроматографии.

Немаловажным для конструирования рекомбинантного штамма-продуцента являлся и выбор типа клеток (генотип) *E.coli*. Диссертант предпочел использовать в своей работе достаточно широко используемые в биотехнологии и доступные исследователям штаммы *E.coli*: origami (DE3) pLysS, BLR, BL21(DE3) pLysS, BLR pLysS, origami (DE3), BL21(DE3), BL21(DE3)-Gold, B834, Top10, MG1655. Полученными экспрессионными плазмидами, с учетом совместимости с регуляторной областью соответствующих генов в составе экспрессионных векторов, Курдюмов А.С. трансформировал эти штаммы и исследовал уровень накопления рекомбинантной дестабилазы 2 и ее локализацию в компартментах клеток *E.coli* (табл. 4 и 5, стр. 82, 83). Результаты, приведенные в табл. 5, убедительно показывают, что дестабилаза обнаруживалась только в составе нерастворимой фракции белков сконструированных штаммов-продуцентов. Этот факт инициировал исследование возможности получения растворимой формы дестабилазы при использовании ее секреторных форм.

В научной литературе показано, что часто при попытках получить эукариотические белки, укладка которых в биологически активную форму с обязательным правильным формированием дисульфидных связей, очень затруднена при гетерологичной экспрессии генов этих белков в клетках прокариот. Используемый подход, связанный с процедурой денатурации-рефолдинга целевого белка, является практически индивидуальным для каждого рекомбинантного белка и проходит с очень низким выходом биологически активной формы продукта экспрессии. В этом случае с целью повышения выхода рекомбинантного белка в растворимой форме используются разные подходы: подбор промоторов, обеспечивающих регулирование и скорости накопления целевого белка, подбор наиболее совместимых штаммов-продуцентов, что уже сделано автором диссертационной работы (см. выше). Одним из вариантов получения рекомбинантного белка является целенаправленная его секреция в периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий, что имеет целый ряд технологических преимуществ, главным из которых можно назвать возможность получения в этом случае активной формы белка с правильно сформированными вторичной и третичной структурами, т.к. транслокация белка в периплазматическое пространство клеток сопровождается воздействием окислительной среды и ряда ферментов периплазматического пространства, облегчающих формирование дисульфидных связей. Кроме того, шапероны периплазматического компартмента клеток способствуют правильному фолдингу целевого белка.

С целью детального исследования возможности такого подхода к получению дестабилазы, автор сконструировал экспрессионные плазмиды, в которых зрелому белку предшествовала лидерная последовательность. Курдюмов А.С. использовал лидерные

последовательности как Sec-системы транслокации (лидерные последовательности прострептавдина из *Streptomyces avidinii*, про-энтеротоксинов А и В из *Staphylococcus aureus*), так и ТАТ-систему (лидерный пептид триметиламин N-оксид-редуктазы из *E.coli*). Все особенности созданных конструкций приведены в табл. 3 (стр.73) и на рис.15 (стр.78), а экспериментальные данные по экспрессии и локализации искусственно полученных вариантов про-дестабилазы – в табл. 5 (стр.83). Из приведенных автором результатов следует, что ни одна из использованных лидерных структур не приводила к транслокации дестабилазы в периплазматическое пространство.

Для повышения растворимости и, в конечном итоге, выхода рекомбинантного белка часто используется вариант экспрессии гена, кодирующего слитой с целевым достаточно хорошо растворимый белок. Автор для исследования этого варианта микробиологического синтеза получил два варианта такого белка: дестабилаза-тиоредоксин (стр.56) и SlyD (шаперон из *E.coli*)-дестабилаза (стр.61). Действительно, полученные гибридные белки были растворимы и, после ферментативного процессинга слитого белка и соответствующей хроматографической очистки, Курдюмов А.С. получил рекомбинантную дестабилазу. Однако, и в этом случае автору не удалось избежать стадии ренатурации белка.

Большой и, несомненно, важной, является часть работы, направленная на исследование оптимальных условий культивирования полученной серии штаммов. Курдюмов А.С. исследовал с применением лабораторного шейкера-инкубатора влияние на эффективность биосинтеза дестабилазы 2 в сконструированных штаммах-продуцентах от температуры культивирования, концентрации индуктора и времени его внесения, состава среды культивирования. Затем эти данные были масштабированы для ферментера (5л). В ходе выполнения этой части диссертационной работы автор отработал и общую схему выделения и очистки рекомбинантной дестабилазы 2, а также условий ее рефолдинга – ступенчатый диализ и рефолдинг с использованием хроматографической ренатурации – получаемого белка. Тщательный анализ полученных результатов позволил автору сделать промежуточные выводы о том, что оптимизация кодонного состава структурной части способствовала повышению уровня накопления дестабилазы 2 в клетках штамма-продуцента примерно на 30% (стр.83) и, в совокупности с разработкой схемы ренатурации рекомбинантной дестабилазы, можно уверенно сказать, что получен эффективный штамм-продуцент этого белка (выход около 30 мг/л, стр.140). Учитывая все характеристики полученных плазмидных конструкций и штаммов-продуцентов на основе клеток *E.coli*, автор диссертации выбрал в качестве рабочего варианта штамм BL21(DE3)-Gold (pET15/N-Dest).

Обширный экспериментальный, сформированный на вышеуказанном этапе, материал позволил Курдюмову А.С. уверенно получить и наработать с использованием прокариотической системы Dest1 и Dest3 – изоформы дестабилазы из *Hirudo medicinalis*.

На основе анализа полученных в ходе работы с прокариотической системой результатов автор сделал вывод о необходимости продолжения исследований по разработке эффективного способа получения дестабилазы. В качестве объекта для такого рода разработки Курдюмов А.С. выбрал дестабилазу 2, данные о биологической активности которой в научной литературе описаны наиболее полно. На этом этапе, учитывая природный источник дестабилазы, диссертант использовал в качестве

реципиентных клетки дрожжей *Pichia pastoris*, хорошо зарекомендовавших себя при конструировании штаммов-продуцентов белков в условиях гетерологичной экспрессии соответствующих генов.

В этой части исследования, как и в предыдущей части, Курдюмов А.С. в полной мере воспользовался доступной системой *Pichia Pink Expression System* (Life Technologies, USA) и сконструировал плазмиду pPink-LC (pLC-Kill-Dest6His), кодирующую Dest2, сигнальный пептид белка-киллера *S. cerevisiae* и С-концевую (6His) аминокислотную последовательность. Интеграция целевого гибридного гена дестабилазы в геном дрожжей позволил получить рекомбинантный штамм-продуцент, секретирующий целевой белок в культуральную среду (дестабилаза2-His6). Выделение и очистка рекомбинантного белка показало, что биосинтетический потенциал сконструированного штамма-продуцента составляет 1,5 мг на литр дрожжевой культуры.

Аналогично, но с использованием сконструированного Курдюмовым А.С. вектора pсDNA3.4-Dest2, содержащего ген, кодирующий pro-Dest2 (собственный сигнальный пептид) и С-концевой 6His, были получены генно-инженерно модифицированные линии клеток почек эмбриона человека (исходная линия – Expi293F). Так же, как и в случае клеток дрожжей, гибридная форма дестабилазы2-His6 эффективно секретировалась в культуральную жидкость, но выход целевого белка, после нативной металл-хелатной хроматографической очистки, был существенно выше и составил 50мг на литр суспензионной культуры.

Т.о., подводя итог данной части диссертационной работы Курдюмова А.С., можно отметить, что все известные изформы дестабилазы были получены и наработаны в прокариотической системе, а дестабилаза2 – в генно-инженерно модифицированных клетках дрожжей *Pichia pastoris* и почек эмбриона человека (Expi293F), что позволило автору приступить к следующей части всего исследования – сравнительному изучению свойств этого полифункционального белка и его изоформ

На начальном этапе этого исследования автор изучил литическую (суммарную мурамидазную и антибактериальную) активность полученных ферментов. Для определения этого параметра диссертант оценил эффект воздействия полученных рекомбинантных белков (N-Dest2 и min-Dest2 и C-Dest2) на суспензию клеток *E.coli* штамма Top10 количественным измерением суммарных белков, высвободившихся из лизированных клеток. В качестве референс-фермента Курдюмов А.С. использовал лизоцим белка куриного яйца (HEWL). Было показано, что N-Dest2 и min-Dest2 при данном способе измерения, обладают активностью, сопоставимой (60-70%) с HEWL, в то время как C-Dest2 таковую практически не проявляла (рис.34, стр.111). Аналогичные данные были продемонстрированы и на примере клеток *B.subtilis*.

В силу того, что полученные белки предполагаются к использованию в кровотоке человека, крайне важным является выяснение оптимальных условий (рН и конц. NaCl). Автором было показано, что изменение литической активности для всех изоформ дестабилаз при различных конц. NaCl и значения рН является практически идентичным (рис.35, стр.112) и активности хорошо коррелирует с этими показателями для кровотока человека.

Поскольку в основе ферментативного разрушения бактериальных клеток лизоцимом лежит, прежде всего, нарушение структуры их клеточной стенки (мурамидазная активность), диссертант исследовал эту активность на примере просветления суспензии клеточных стенок *M. lysodeikticus*. Автор не только подтвердил наличие такой активности у полученных изоформ дестабилаз, но и исследовал ее проявление в зависимости от значения pH и ионной силы раствора. Было обнаружено, что наибольшую мурамидазную активность полученные дестабилазы проявляют при pH 2,2 и 6,3, причем оптимальная концентрация хлористого натрия при этом оставляет 150мМ и 0 мМ, соответственно (рис.38, стр.116). Этот факт не является оптимальным для использования полученных дестабилаз в качестве потенциального терапевтического препарата. Дальнейшее сравнение мурамидазной активности рекомбинантных дестабилаз показало, что наибольшей активностью обладает Dest2, полученная из слитого белка SlyD-Dest2 (в 5 раз превосходит активность контрольного HEWL), а ее аналоги, полученные из клеток человека и дрожжей проявляли схожую активность, но только в 3 раза превосходит активность HEWL. При этом мурамидазная активность Dest2, полученной из телец включения *E.coli*, составила только 20% от контрольной активности (рис.39, стр.117).

Центральной исследуемой активностью у полученных дестабилаз является способность к гидролизу изопептидных связей. На примере хромогенного субстрата (L- γ -Glu-pNA) диссертантом была проанализирована зависимость изопептидазной активности от времени инкубации, ионной силы буфера, значения pH и концентрации фермента (рис.40, стр.118 и табл.7, стр.120). Из этой таблицы приведенные по основным ферментативным активностям (мурамидазная и изопептидазная) показатели позволяют сделать предварительный выбор в пользу дестабилазы 2, полученной в клетках Expi293F.

Автор диссертационной работы понимал, что, во многом для подтверждения и дополнительного исследования функциональной активности рекомбинантных дестабилаз, необходимо было изучение гидролиза модельного тромба *in vitro*. В качестве такой модели Курдюмов А.С. использовал стабилизированный фибрин (основной компонент тромба), который подвергал воздействию дестабилазы 3 (рис.43, стр. 122). Электрофоретический анализ спектра белков после инкубации стабилизированного фибрина (96 час. при темп.37°C) позволил автору утверждать, что дестабилаза действительно гидролизует γ - γ цепи стабилизированного фибрина. Сравнительная фибринолитическая активность рекомбинантных дестабилаз 2 из различных источников показала, что по этому показателю белки располагаются в ряду: Dest2-SlyD $\geq$ Dest2-Expi > Dest2-Yeast >> Dest2-IB.

Независимыми экспериментами автор подтвердил, что дестабилаза, даже в малых концентрациях (5мкг/мл), ингибирует рост клеток *E.coli* и *B.subtilis* в жидкой среде. Более того, было продемонстрировано, что триптический гидролизат этого фермента также проявляет это свойство. Аналогичные результаты были получены при определении минимальной ингибирующей концентрации (МИК) дестабилазы. При этом триптические фрагменты дестабилаз проявляли даже бóльшую активность как по отношению к клеткам *E.coli*, так и *B.subtilis*.

Прямым подтверждением наличия именно изопептидазной ферментативной активности у дестабилаз явились дополнительные эксперименты по гидролизу изопептида γ -Glu- ϵ -Lys в ходе которых автор показал, что рефолдированная из телец включения дестабилаза (*E.coli*) не обладает изопептидной активностью, в то время как дестабилаза из *P.pastoris*, из слитого белка SlyD-Dest2 (*E.coli*) и из линии клеток человека Expi293F такую активность проявляют. Эта активность проявляется на фоне полного отсутствия у указанных дестабилаз протеолитической активности по отношению к дипептиду с природной альфа-пептидной связью.

Подводя итог анализу полученных в рецензируемой диссертации результатов, хотелось бы отметить, что Курдюмов А.С. представил большой и доказательный экспериментальный материал, который не только свидетельствует о том, что автор является высококвалифицированным специалистом, но и убедительно подчеркивает, что в результате проведенного исследования получен один из полифункциональных ферментов, перспективных для практической медицины, и изучены его свойства. Более того, Курдюмов А.С. разработал общий принцип (схему) получения этого фермента – от получения продуцента рекомбинантного белка, полной характеристики его ферментативных свойств до отработки метода очистки целевого белка. Тем самым можно утверждать, что созданы все предпосылки для продолжения, после согласования с практикующими медицинскими работниками, всех необходимых этапов исследований для полноформатного проведения до- и клинических исследований нового тромболитического препарата, который может быть, в конечном итоге, получен на основе рекомбинантной дестабилазы.

Тем не менее, я должен высказать ряд критических замечаний.

1. Текст работы достаточно плотно насыщен орфографическими и стилистическими ошибками и даже цифровыми опечатками. Например, на стр. 53 слитой белок назван SlyD-Dest2, а на стр. 61 уже Dest2-SlyD, хотя на этой же странице в составе плазмиды указывается ген, кодирующий именно SlyD-Dest2. Для некоторых рисунков подписи не в полной мере соответствуют содержанию рисунков. Список литературы не приведен к общепринятому формату и, в частности, конечные страницы цитируемых работ указаны не полностью.
2. В связи с обилием экспериментального материала, автору необходимо было хорошо продумать формат его преподнесения в диссертационной работе. Избранная Курдюмовым А.С. тактика изложения полученных результатов, на мой взгляд, не может быть признана оптимальной, т.к. она превращает чтение материалов диссертации в своеобразный детектив, в котором постоянно приходится возвращаться к представленным ранее результатам (таблицам, рисункам и т.д.). В этом аспекте было бы хорошо в процессе описания результатов давать в краткой форме некоторые выводы по приведенным данным, чтобы логично обосновать переход к следующему этапу исследования. Конечно, читатель может сделать такой вывод и сам, но мнение автора, все-таки, хотелось бы услышать. Это же относится к некоторой недосказанности в описании экспериментальных данных. Например, Курдюмов А.С. приводит в своей работе информацию по конструированию 16 плазмид для получения штамма-продуцента на основе клеток дрожжей *P.pastoris*: «Мы получили все шестнадцать возможных вариантов

плазмид, кодирующих Dest2, следуя схеме, рекомендованной производителем набора» (стр.54). Но, в конечном итоге, он использовал плазмиду pLC-Kill-Dest6His. Для широкого круга читателей было бы полезно знать судьбу остальных 15 плазмид и, если отбор производился на основе продуктивности рекомбинантных штаммов-продуцентов, то хорошо было бы привести табличные данные по остальным вариантам плазмид.

Глава диссертации «Обсуждение результатов», к сожалению, во многом не восполняет недостаток вышеуказанной информации.

3. В диссертационной работе приведены, на мой взгляд, излишние подробности в описании структур достаточно хорошо известных реципиентных плазмид. Достаточно было привести линейное отражение именно искусственно введенных в их состав фрагментов ДНК, что существенно упростило бы читателю представление об их структуре, а, заодно, и уменьшило общий объем рукописи.

4. При исследовании изопептидазной активности дестабилазы 2 Курдюмов А.С. использовал в качестве субстрата изодипептид γ -Glu- ϵ -Lys, а в качестве контроля – дипептид Gly-Gly, что не может быть признано совсем равноценным дипептиду Glu-Lys, хотя бы по заряду, который несут аминокислотные остатки в составе дипептида.

5. Из полученных диссертантом результатов по сравнительному исследованию активности нативной и рекомбинантных дестабилаз можно предположить, что важную роль в формировании биологически активной формы дестабилазы выполняют дисульфидные связи в составе молекулы. Было бы полезно провести сравнение количества такого рода связей в дестабилазах различного происхождения (нативная и рекомбинантные) с использованием, например, реактива Элмана. Эти данные могут дать возможность предварительного анализа связи ферментативной активности дестабилазы и полноты замыкания остатков цистеина в этом классе ферментов.

6. Очень любопытными являются полученные Курдюмовым А.С. данные об антимикробной активности фрагментов дестабилазы после ее трипсинолиза. На мой взгляд, было бы полезно экспериментально проанализировать как полноту такого трипсинолиза, так и структуру фрагментов полипептида, образующихся при такого рода гидролизе. Эти данные могут быть легко получены с использованием современных масс-спектрометров (MALDI TOF/TOF) и дать возможность дальнейшего выявления как природы этой активности, так и пониманию структуры наиболее активного(-ых) фрагмента(-ов) полипептидной цепи дестабилазы, несущего(-их) антимикробную функцию.

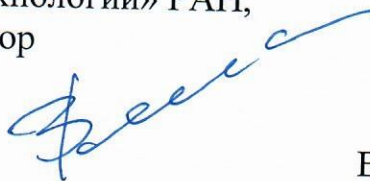
Конечно, высказанные выше замечания (кроме формата представления экспериментальных результатов), носят характер пожеланий автору и, возможно, предложенные эксперименты уже запланированы Курдюмовым А.С. для дальнейших лабораторных исследований.

Полученные в диссертационной работе данные достаточно полно опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных научных изданиях (3 статьи) и неоднократно представлялись на конференциях (8 тезисов), т.е. представлены широкому слою, специалистов, занимающихся аналогичными исследованиями. Приведенные в работе выводы корректно отражают полученные автором научные результаты.

Автореферат полностью соответствует материалам диссертационной работы.

Таким образом, по актуальности проведенного исследования, новизне полученных результатов, методическому уровню и адекватности используемых экспериментальных подходов и безусловной практической значимости выявленных особенностей функционирования рекомбинантной дестабилазы диссертация Курдюмова Алексея Сергеевича «Получение и свойства рекомбинантной дестабилазы – полифункционального фермента медицинской пиявки» полностью соответствует требованиям п.9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013г. №842, предъявляемым к работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Курдюмов А.С. – заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Главный научный сотрудник
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные проблемы биотехнологии» РАН,
доктор биологических наук, профессор



Вейко В. П.

Вейко Владимир Петрович
Адрес: 119071, ФИЦ Биотехнологии РАН
г.Москва, Ленинский проспект, д.33, корп.2
+7 (495) 954-5283
E-mail: vladveiko@yahoo.com

Подпись д.б.н, проф. Вейко В.П. заверяю
Ученый секретарь
ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.




Орловский А.Ф.

« 14 » ноября 2017г.