

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 учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ: Диссертационная работа Курдюмова Алексея Сергеевича посвящена получению рекомбинантных форм полифункционального фермента дестабилазы, выделяемой в нативной форме из секрета слонных желез медицинской пиявки, и исследованию свойств этого фермента. Дестабилазы принадлежат относительно новому семейству полифункциональных лизоцимов беспозвоночных, сочетающих в себе изопептидазную (тромболитическую) и мурамидазную (лизоцимную) активности. Эти ферменты способны расщеплять стабилизированный фибрин в составе сосудистых тромбов, и поэтому являются потенциальной основой нового класса тромболитических препаратов, которые востребованы как для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний, для пациентов с тромбофлебитом, пациентов гематологических клиник с нарушениями системы свёртываемости крови или лечения таких острых состояний как диссеминированное внутрисосудистое свёртывание (ДВС-синдром). Учитывая тот факт, что предыдущие попытки получить рекомбинантные формы дестабилазы 2 (Dest2) и её изоформ в растворимом виде были малоэффективными, то те задачи, которые ставит для себя автор работы, а именно: разработать эффективный способ получения растворимых форм дестабилазы, получить этот фермент в достаточном количестве и исследовать его свойства, – несомненно является крайне актуальной и интересной.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА: Попытки получить рекомбинантную Dest2 предпринимались и раньше. Однако выход продукта в *E.coli* был очень низким, а попытки получить Dest2 в других экспрессионных системах, таких как дрожжи оказались безуспешными. Научная новизна этой работы состоит в том, что впервые в клетках *E. coli* были получены все известные изоформы дестабилазы: Dest1, Dest2 и Dest3. Впервые получена рекомбинантная Dest2 в эукариотических системах экспрессии: в дрожжах и культуре клеток человека. Автором разработан метод получения дестабилаз в *E.coli* в тельцах включения с дальнейшей денатурацией-рефолдингом белка, который позволяет получить исследуемые белки в растворимой форме. Эффективность этого метода в несколько раз

превышает все предыдущие методы. Это позволило исследовать мурамидазную, изопептидазную, фибринолитическую и антимикробную активности у всех полученных Dest. Впервые определены зависимости мурамидазной и изопептидазной активностей от pH и ионной силы среды. Впервые показана антимикробная активность триптических пептидов Dest по отношению к грамотрицательным (*E. coli*) и грамположительным (*Bacillus subtilis*) бактериям.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ: Диссертационная работа Курдюмова А.С. представляет несомненную практическую значимость. Несмотря на то, что в настоящее время существует достаточно много эффективных тромболитических препаратов, все они имеют свои недостатки. Одни действуют слишком медленно, вызывают пирогенную и аллергическую реакцию, другие – слишком быстро и массивно, что может приводить к кровотечениям и развитию реокклюзии в месте лизированного тромба. Конечно, в этой связи актуален поиск новых тромболитических препаратов и методов лечения. Дестабилазы представляют собой перспективный класс тромболитических ферментов, способных растворять тромбы, образованные стабилизированным фибрином. А тот факт, что дестабилазы являются полифункциональными ферментами, обладающими мурамидазной и антимикробной активностями, делает их привлекательными и перспективными веществами для применения у пациентов, находящихся в таких сложных состояниях как сепсис, или для применения в полевых условиях.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ: Диссертация Курдюмова Алексея Сергеевича написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения и библиографического списка литературы. Диссертация изложена на 159 страницах и содержит 49 рисунков и 9 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 147 источников, 23 из которых – работы, опубликованные в отечественных изданиях.

Работа написана хорошим литературным языком и поэтому легко читается. В обзоре литературы приводятся сведения о работе системы свёртывания крови, механизмах тромбообразования. После этого автор логично переходит к описанию существующих на сегодняшний день тромболитических препаратов и указывает на медицинскую пиявку, как на источник большого разнообразия ферментов (в том числе дестабилазы), влияющих на свёртываемость крови. Далее следует подробное описание изопептидазной, мурамидазной и антимикробной функций дестабилазы, а также приводится полное изложение попыток получения рекомбинантной дестабилазы.

Раздел материалы и методы написан подробно и основательно. Все методики описаны так, чтобы их можно было воспроизвести. Автором освоено широкий спектр методов генной инженерии, такие как конструирование плазмид с заданными свойствами и синтез конструкторов с оптимизированным кодонным составом, микробиологии и клеточной биологии – это экспрессия рекомбинантных белков в бактериях и дрожжах, в линии клеток человека, выделение белков; физико-химической биологии – это и металл-хелатная аффинная хроматография, и ионообменная хроматография, и биохимии – это переводение белка в денатурированное состояние и рефолдирование белка с помощью ступенчатого диализа, исследование зависимости раствора белка от pH и ионной силы растворителя; и даже круговой дихроизм. Автором подробно описаны функциональные тесты по определению изопептидазной, мурамидазной и антимикробной активностей полученных белков. Таким образом, Курдюмов А.С. является отлично подготовленным в методическом и методологическом плане исследователем, владеющим всеми необходимыми методами для проведения научной работы.

Основной раздел диссертации посвящён результатам. Большая часть этого раздела посвящена получению рекомбинантного белка Dest2 в *E.coli*. Для экспрессии белка автор сконструировал 13 плазмид, отличающихся промоторами, сигнальными пептидами, наличием или отсутствием гистидинового хвоста для дальнейшей очистки белка, дополнительными белками-шаперонами. Для того чтобы выработать эффективный метод получения исследуемого белка, автор перебрал 8 штаммов бактерий-продуцентов, семь различных питательных сред, варьировал многие параметры, такие как тип индуктора экспрессии, температура роста бактерий, временной режим добавления индуктора. В результате этой работы в качестве наиболее подходящих были выбраны 3 плазмиды с промотором поздних генов бактериофага T7, кодирующие Dest2 без сигнального пептида, без гистидинового хвоста (pETmin/min-Dest), и оптимизированные по кодонному составу плазмиды с гистидиновым хвостом на N- и C-конце рекомбинантного белка (pET-15/N-Dest+ и pETmin/C-Dest+). Автору удалось получить Dest2 и его изоформы в нерастворимом виде в тельцах включения, поэтому следующая большая часть работы была посвящена оптимизации метода ренатурации выделенного белка. Для этих целей использовалась как металл-хелатная аффинная хроматография (для вариантов белка с гистидиновыми хвостами) с последующим градиентным диализом, так и катионообменную хроматографию или ренатурацию неочищенного белка с последующей ионообменной хроматографией (для вариантов белка без гистидиновых хвостов). В каждом случае отдельно подбирались оптимальный состав и pH используемых буферов. В результате огромной методической работы был разработан метод получения

рефолдированных белков Dest, который в несколько раз по своей эффективности превосходит все предыдущие. Автору также удалось получить Dest2, слитый с белком теплового шока SlyD, в растворимой форме непосредственно в *E.coli*. Однако, к сожалению, после отщепления шаперонного белка TEV-протеазой белок переходил в нерастворимую форму, его приходилось денатурировать и очищать с помощью хроматографии, что в итоге приводило к снижению эффективности получения целевого продукта. Также Dest2 был впервые получен в дрожжах и в человеческой клеточной линии Expi293F.

В работе проводится подробный анализ литической, мурамидазной, изопептидазной и фибринолитической активностей выделенных ферментов. Литическую активность определяли по суммарному выделившемуся белку из бактерий, инкубированных с Dest. Определяли зависимость этой активности от pH и ионной силы раствора. Мурамидазную активность определяли по просветлению суспензии клеточных стенок *Micrococcus lysodeikticus*. Было установлено, что рекомбинантные дестабилазы проявляют мурамидазную активность в широком диапазоне pH, имея два максимума при pH 2,2 и 6,3, при этом наибольшая активность наблюдалась в растворах с низкой ионной силой. Наконец, была исследована фибринолитическая активность Dest2, полученной в разных системах экспрессии. Было показано, что дестабилаза эффективно расщепляет γ - γ цепи стабилизированного фибрина. Эта активность выше в 2 раза у растворимых форм белка, полученных в дрожжах и линии человеческих клеток, по сравнению с ренатурированным белком из телец включения *E.coli*.

Отдельный научный интерес представляет проведенная автором работа по исследованию активности дестабилазы, приводящей не к лизису, а к ингибированию роста бактерий. Автор убедительно это показывает при инкубации триптических пептидов Dest3 (которые не проявляют мурамидазной активности) с бактериями *E.coli* и последующим высеванием их в лимитирующих разведениях на твердой питательной среде. Этим же способом было показано, что не обладающая лизоцимной активностью форма C-Dest2 с гистидиновым хвостом на C-конце, ренатурированная из телец включения *E.coli*, обладает в то же время антибактериальной активностью. Причем, эта активность наблюдается как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Это явление, несомненно, следует изучать и далее, что может привести к открытию новых механизмов неспецифического иммунитета.

В целом, работа написана интересно и её продолжение может привести к неожиданным научным открытиям и, несомненно, будет способствовать лучшему пониманию функционирования дестабилаз. Тем не менее, я должен высказать несколько

критических замечаний, которые, впрочем, никак не умаляют научной значимости этой работы, и задать несколько вопросов.

Во-первых, большинство результатов по оптимизации получения дестабилазы приведено для Dest2, хотя в литературном обзоре автор указывает, что мурамидазная активность Dest3 в четыре раза превосходит Dest2. Чем обусловлен выбор автора?

Во-вторых, почему мурамидазную активность определяли двумя методами – по количеству выделившегося белка из *E.coli* и по просветлению раствора клеточных стенок *Micrococcus lysodeikticus*? Эти активности обладают различной природой? Какие ставили контроли при первом методе? Если не удаляли саму дестабилазу из образца, то неудивительно, что зависимость концентрации выпавшего белка имеет линейную зависимость от концентрации дестабилазы.

В-третьих, автор показал, что дестабилаза, рефолдированная из телец включения *E.coli*, не расщепляет специфичный хроматогенный субстрат диизопептида γ -Glu- ϵ -Lys, в отличие от растворимых форм дестабилазы, полученных в эукариотических клетках? В чём может быть причина, по мнению автора работы?

И, наконец, я должен отметить, что автором потрачено много усилий для того, чтобы добиться получения ренатурированного белка дестабилазы в *E.coli*, но мало внимания уделяется получению этого фермента в эукариотических клетках. В то же время, именно дестабилаза, полученная в дрожжах и в линии человеческих клеток, получена сразу в растворимой форме и обладает более выраженной мурамидазной активностью, изопептидазной активностью и антибактериальной активностью. Соответственно, возникает вопрос, почему автор обделил своим вниманием эти формы дестабилазы и в чём причина этих различий?

Следует отметить, что эти вопросы ни в коей мере не умаляют высокой научной значимости полученных результатов и не снижают хорошего впечатления от этой основательной и серьёзной работы. В работе заключён потенциал, который при развитии этой темы будет способствовать новым научным открытиям в области антибактериальной активности дестабилаз, не связанной с лизоцимной функцией, а кроме того, эта работа позволит провести всесторонний анализ свойств дестабилаз и приблизить их применение в клинической практике.

Всё вышеперечисленное позволяет заключить, что работа Курдюмова А.С. на тему «Получение и свойства рекомбинантной дестабилазы – полифункционального фермента медицинской пиявки», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 «биохимия» является самостоятельным законченным научным исследованием. Автор полностью выполнил поставленные перед

собой задачи и добился искомой цели. Приведённые в работе выводы соответствуют полученным экспериментальным данным, а автореферат соответствует диссертации. По уровню научных исследований и значимости диссертационная работа Курдюмова Алексея Сергеевича «Получение и свойства рекомбинантной дестабилазы – полифункционального фермента медицинской пиявки» соответствует критериям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 с внесенными изменениями от 21 апреля 2016 г. №335, является научно-квалификационной, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Старший научный сотрудник лаборатории Физиологии кроветворения
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр гематологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, к.б.н.
Евгеньевич



Бигильдеев Алексей

13.11.2017 г.

145167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

+7(495)6122123

Bigildeev.a@blood.ru

Подпись ст.н.с. лаб. Физиологии кроветворения Бигильдеева Алексея Евгеньевича
заверяю



Учёный секретарь, к.м.н. Джулакян Унан Левонович