

ОТЗЫВ

официального оппонента, ведущего научного сотрудника со степенью доктора наук с возложением обязанностей заведующего лабораторией наноструктур и нанотехнологий ФГБУН ИТЭБ РАН, доктора химических наук Шляпникова Юрия Михайловича на диссертацию Замятиной Анны Валерьевны на тему: «Иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II *Bacillus cereus*»

Актуальность темы

Белковые токсины бактериального происхождения являются абсолютными рекордсменами по токсичности. Эволюция снабдила бактериальные патогены уникальными инструментами оказания токсического действия на самые разнообразные мишени, которые не только могут быть причиной смертельно опасных инфекционных заболеваний, но и являются важным инструментом изучения механизмов функционирования этих мишеней. В связи с этим, изучение бактериальных токсинов имеет существенное фундаментальное и прикладное значение.

Основным объектом исследования в диссертационной работе Замятиной А.В. является один из основных факторов патогенности *Bacillus cereus* – гемолизин II (HlyII), относящийся к классу β -складчатых каналобразующих цитолизин. HlyII продуцируется бактерией как водорастворимый мономер, но в присутствии мембраны клеток инфицированного организма мономеры токсина соединяются, встраиваются в липидный бислой клеточной мембраны и образуют пору.

Полипептид HlyII значительно длиннее своих гомологов в основном за счет присутствия в его первичной структуре С-концевого домена (HlyIICTD). Делеция 94 аминокислотных остатка с С-конца приводит к образованию белка приводит к снижению гемолитической активности в 8 раз, что ставит вопрос о функциональной роли С-концевого домена гемолизина II.

Вышеизложенные тезисы послужили предпосылкой для постановки Замятиной А.В. фундаментальной цели: провести иммунохимический анализ С-терминального домена гемолизина II секретируемого *V. cereus* и выявить его возможную роль в процессе порообразования. Таким образом, тема диссертационного исследования Замятиной А.В. является актуальной.

Научная новизна полученных результатов

Диссертационная работа Замятиной А.В. обладает высокой научной новизной. Получены 24 стабильных гибридных клон, продуцирующих моноклональные антитела к различным участкам рекомбинантного препарата НлуИСТД. Высокая специфичность полученных моноклональных антител позволила использовать их как инструмент исследования для определения функциональной роли НлуИСТД. Определен эпитоп антитела НлуИС-15, распознающего тромбиновый сайт. Обнаружено антитело НлуИС-20, способное подавлять цитолитическую активность гемолизина II. Штамм-специфическая нейтрализация токсина была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Продemonстрирована способность НлуИСТД связываться с клеточными мембранами с использованием МА. Также впервые продемонстрирована способность НлуИСТД образовывать олигомерные формы в присутствии эритроцитов. Показано, что НлуИСТД наиболее эффективно разрушал клетки Т-клеточного происхождения, в меньшей степени макрофагального происхождения и не действовал на клетки В-клеточного происхождения.

Следует отдельно отметить, что большое внимание в диссертационном исследовании Замятиной А.В. уделяется измерению термодинамических характеристик изучаемых процессов. В частности, в работе определены константы аффинности полученных в работе моноклональных антител, которые могут быть важны при конструировании иммунохимических тест-систем для определения НлуИСТД. Кроме того, измерены количественные

показатели взаимодействия HlyIICTD с мембранами эритроцитов и клеток иммунной системы, что является ценным фундаментальным результатом.

Практическая значимость работы

Заболевания, вызванные бактериальными патогенами, продуцирующими гемолитические токсины, например, гемолизин II *B. cereus* и α -токсин *S. aureus*, зачастую имеют схожую симптоматику. В связи с этим, для выбора терапевтической стратегии требуется точное определение возбудителя инфекции. В частности, актуальной является задача разработки диагностических тест-систем для определения гемолизина II, как одного из ключевых вирулентных факторов *B. cereus*. Полученная представительная панель высокоспецифических моноклональных антител может быть использована для их разработки.

Выбор участка молекулы в качестве терапевтической мишени важен для разработки высокоспецифичных и безвредных вакцин, а также терапевтических и диагностических антител. В развитии этого направления важно получение и определение механизмов защитного действия антитела против HlyIICTD, состоящего в блокировании гемолитической активности токсина. Этот результат может быть полезным как при создании миметиков, так и препаратов, нейтрализующих действие HlyII *B. cereus*, на фоне растущей антибиотикорезистентности микроорганизмов.

Общая оценка содержания диссертационной работы

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 133 страницах, содержит 32 рисунка, 9 таблиц и 4 формулы. Список литературы включает 247 источников отечественной и зарубежной литературы.

Во введении автор последовательно и подробно раскрывает актуальность темы исследования, формулирует его цель и задачи, описывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методы исследования, представляет основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и сведения об апробации полученных результатов.

В обзоре литературы Замятина А.В. грамотно излагает данные как об общей характеристике бактериальных токсинов, так и о более узкой области порообразующих токсинов *B. cereus*.

Глава «Материалы и методы исследования» исследования посвящена описанию объектов и методов исследования. Диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современных и разнообразных биохимических методов, позволяющих полностью решить поставленные задачи: гибридная технология, фаговый дисплей, проточная цитофлуориметрия, иммуноблоттинг. Протоколы описаны детально с уточнением всех условий проведения экспериментов. Методы статистического анализа являются адекватными.

Результаты собственных исследований представлены в главе 3. Достоинством данного раздела является логичность и последовательность изложения материала. На основании полученных результатов делаются промежуточные выводы и обосновываются дальнейшие эксперименты.

Сначала автор подробно описывает получение моноклональных антител к НлуИСТД по гибридной технологии и проводит их детальную характеристику: определение изотипа и констант афинности. Отдельная часть работы посвящена определению эпитопа связывания антитела методом фагового дисплея. На следующем этапе полученные антитела используются для изучения гемолиза эритроцитов под действием гемолизина. Наконец, в Главах 3.5 и 3.6 описаны результаты детального исследования взаимодействия НлуИСТД с клеточными мембранами эритроцитов и клеток иммунной системы.

На основании полученных результатов и обсуждения сформулированы 6 выводов, которые базируются на достоверном фактическом материале, мощной экспериментальной базе, адекватной статистической обработке. Выводы обоснованы полученными результатами и в полном объеме соответствуют поставленным задачам.

Список литературы полон и содержит источники последних лет.

Содержание автореферата в полной мере отражает основные положения диссертации. Материалы диссертации опубликованы в 20 печатных работах, в том числе в 5 статьях в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Результаты работы представлены в виде устных и постерных докладов на 15 конференциях.

Замечания к работе:

1. На стр. 46 использовано ошибочное название «ортофенилендиамин» вместо корректного «орто-фенилендиамин».
2. На стр. 52 использовано ошибочное название «диаминобензидин-3,3-тетрагидрохлорид» вместо корректного «тетрагидрохлорид 3,3'-диаминобензидина».
3. Из текста работы неясно происхождение коэффициента 2×10^{14} в формуле 2 (стр. 58).
4. На стр. 74 и 77 использовано ошибочное название «*B. subtilus*» вместо корректного «*B. subtilis*».
5. В названии Главы 3.4.4. использован ошибочный термин «первичная последовательность» вместо корректного «первичная структура».
6. В Главе 3 приведено чрезмерно подробное описание общеизвестных подходов, в частности, гибридной технологии, что делает изложение отдельных частей работы тяжелым для восприятия.

Также имеется ряд вопросов по содержанию работы:

1. С чем связано использование для получения биотинилированного НлуИСТД столь высокого избытка биотинилирующего агента – 20 эквивалентов? С

учетом того, что в последовательности HlyIICTD всего 13 остатков лизина, такое соотношение приводит к исчерпывающему биотинилированию всех стерически доступных остатков лизина. Каким образом это обстоятельство сказывается на функциональной активности HlyIICTD, в том числе, на измеренных значениях констант аффинности (Таблица 8)?

2. Какому значению оптической плотности на Рис. 25 соответствует насыщение по концентрации небитинилированного HlyIICTD (предел при $c(\text{HlyIICTD}) \rightarrow \infty$)? По форме графика можно предположить, что это значение близко к 0,05. Согласно Рис. 25, добавление HlyIICTD в концентрации, равной концентрации HlyIICTD-bio, приводит к уменьшению сигнала не в 2 раза, а минимум в 4. Не свидетельствуют ли эти данные о существенно более низкой аффинности HlyIICTD-bio по сравнению с HlyIICTD?
3. Согласно полученным в работе результатам, олигомеры HlyIICTD невероятно устойчивы и выдерживают кипячение в SDS, т. е. процесс олигомеризации является термодинамически очень выгодным. Вместе с тем, HlyIICTD самопроизвольно не олигомеризуется, этот процесс идет только в присутствии катализатора – клеточной мембраны. Таким образом, можно констатировать наличие у процесса олигомеризации значительного кинетического барьера. В чем, по мнению диссертанта, может состоять природа этого барьера, и за счет чего он может снижаться в присутствии клеточной мембраны?
4. Также было бы интересно узнать мнение автора, в чем состоит уникальность мембраны В-лимфоцитов. Из описанных в работе результатов следует, что HlyIICTD способен связываться с мембранами самых разнообразных клеток: эритроциты, макрофаги, Т-клетки, но не связывается с мембранами В-лимфоцитов. Такая негативная селективность выглядит парадоксально.

Сделанные несущественные замечания не умаляют достоинств данной работы, высокая значимость и научная новизна полученных результатов, а также обоснованность сделанных выводов не вызывают сомнений.

