

Отзыв официального оппонента на диссертацию Красильниковой Екатерины Александровны «Поиск факторов избирательной вирулентности полевоочьих штаммов *Yersinia pestis*», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность темы диссертации

Несмотря на значительные успехи в изучении генома возбудителя чумы, многие параметры внутривидовой изменчивости этого патогена остаются невыясненными. Определение возможных причин избирательной вирулентности неосновного подвида чумного микроба (*Y. pestis* subsp. *microti*), очевидно, является актуальным направлением научных исследований. Соответственно, актуальна и цель рецензируемого исследования, заключающаяся в поиске молекулярных основ «избирательной» вирулентности штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*.

Степень обоснованности научных исследований, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Е.А. Красильниковой представляет собой завершённое исследование, выполненное на высоком научно-методическом уровне. Обоснованность научных положений, выносимых на защиту, выводов и рекомендаций подтверждаются объективностью экспериментальных данных, которые были корректно проанализированы диссертантом. Значительный объём исследований, проведенных при использовании комплекса адекватных современных методов, позволил последовательно решить стоявшие перед автором задачи, достичь поставленной цели, обосновать все положения, выводы и практические рекомендации.

Достоверность и новизна исследования и полученных результатов

Степень достоверности результатов исследования основывается на использовании статистически обработанного фактического материала, полученного в повторяющихся экспериментах. Достоверность результатов исследования подтверждается табличными и графическими данными, их грамотной интерпретацией и, поэтому, не вызывает сомнений. Новизна достигнутых результатов и выводов не противоречит основным сведениям, полученным ранее другими авторами.

Выявлены пять белков (WP_050548832.1, EIR69411.1, WP_002209962.1, WP_038931127.1, WP_016599821.1), экспрессия которых увеличивалась у высоковирулентных для морских свинок субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, выращенных *in vivo* – в диализных камерах, имплантированных в полость брюшины морских свинок. Впервые показано, что мутация по гену *htpG* не влияет на вирулентность штаммов *Y. pestis* основного подвида и bv. *ulegeica* для мышей и морских свинок. Впервые получены экспериментальные доказательства отсутствия влияния одиночной нокаутной мутации по гену *glnA* на вирулентность штаммов *Y. pestis* основного подвида для мышей и морских свинок, а для аттенуации в отношении двух видов животных требуется генетический нокаут всего *glnALG* оперона. Впервые установлено, что Δ *glnALG* штамм *Y. pestis* не вызывает гибели мышей и морских свинок при подкожном введении и обеспечивает 100 %-ную защиту животных при последующем заражении вирулентным

штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 DCL. Впервые доказано, что делеция гена *metQ* ведет к аттенуации штамма *Y. pestis* основного подвида и для мышей, и для морских свинок.

Приоритет предложенного способа сенсibilизации планшета для иммуноферментного анализа нерастворимыми белковыми антигенами защищен патентом на изобретение № RU 2 732 013 C1, МПК G01N 33/569.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Разработана методика культивирования вирулентных штаммов чумного микроба в перитонеальной полости морских свинок с использованием камер из диализной мембраны.

Определено инактивирующее действие химических реагентов для получения безопасных препаратов белков из вирулентных штаммов *Y. pestis*, пригодных после разделения путем двумерного электрофореза для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» депонированы штаммы *Y. pestis* (федеральный уровень внедрения), дефектные по синтезу глутаминсинтетазы и продуктов двухкомпонентной системы регуляции глутамина, глутаминсинтетазы, белка теплового шока и субстрат-связывающей единицы ABC-транспортера метионина, а также штаммы-продуценты рекомбинантных белков Fba, HtpG, MetQ и GlnA чумного микроба.

Предложены методические рекомендации учережденческого уровня «Подготовка и анализ препаратов белков из штаммов чумного микроба методом двумерного гель-электрофореза в неравновесном градиенте pH» и «Модельная система для исследования изменений, ассоциированных с адаптацией возбудителя чумы к организму млекопитающего».

Результаты диссертационной работы используются в лекционных материалах и на практических занятиях при подготовке кадров высшей квалификации и слушателей курсов дополнительного профессионального образования.

К перечисленным в диссертации результатам, имеющим практическое и теоретическое значение, следовало бы добавить, что автором получено ещё одно подтверждение отсутствия корреляций между уровнем иммуноглобулинов в сыворотки, специфичных к отдельным белкам- кандидатам на бесклеточную вакцину и реальной протективностью вакцины, измеренной в летальном тесте. Этот результат ещё раз подчеркивает необходимость аккуратного отношения к формулирования субъективных вакцин.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключающееся в подборе и анализе научной литературы, планировании и выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических экспериментов, обсуждении полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, написании и оформлении статей и тезисов, не вызывает сомнения и подтверждается последовательностью и логичностью изложения литературного обзора, результатов исследования, заключения и выводов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 159 листах компьютерного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных

исследований, заключения, выводов, раздела «Практические рекомендации», перечня сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов, списка использованной литературы, включающего 310 источников, в том числе 11 отечественных и 299 - иностранных авторов и списка работ, опубликованных по теме диссертации. Текст иллюстрирован 10 таблицами и 26 рисунками. Исследования выполнены в рамках плановой НИР, выполняемой по государственному контракту и поддержаны грантом Российского научного фонда. Результаты исследований Е.А. Красильниковой были доложены на семи российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 3 статьи в международных и российских реферируемых журналах, 1 статья в журнале РИНЦ, 1 патент и 7 тезисов в материалах научных конференций.

Содержание диссертации, её завершенность

Во введении автором обоснованы актуальность исследования, сформулированы цель, четыре задачи исследования, приведена информация по новизне, теоретической и практической значимости, степени достоверности и апробации полученных результатов. Три положения, выносимые на защиту, отражают результаты работы, их научная весомость вполне соответствует уровню кандидатской диссертации и не вызывают возражений по сути и форме изложения. Описана структура диссертации, дана информация о публикациях. В первой главе диссертационной работы - «Обзоре литературы» - проанализированы данные научных публикаций, касающиеся разных аспектов исследуемой проблемы. Кратко изложены сведения о номенклатуре вида и «классических» факторах патогенности чумного микроба, подробно рассмотрены выявленные в последние годы ряд новых кандидатов на роль факторов патогенности чумного микроба, в том числе и факторы нутриционной вирулентности. Рассмотрено использование протеомного подхода для выявления факторов патогенности чумного микроба. Обзор основан на использовании большого объема научных данных, изложенных логично и грамотно. Автор диссертации проявляет себя эрудированным специалистом, знающим современную научную литературу. В целом, содержание «Обзора литературы» полностью вводит читающего в курс решаемых диссертантом задач и свидетельствует не только об актуальности темы исследования, но и о том, что диссертант хорошо ее теоретически проработал. Обзор кратким «Заключением», в котором автор обосновывает сформулированную цель исследования, постановку задач и методов их решения. Таким образом, представленный обзор литературы, в котором достаточно обстоятельно освещены основные вопросы, относящиеся к предмету исследований соискателя, заслуживает положительной оценки.

Глава 2 «Материалы и методы» свидетельствует о том, что автором применен широкий спектр методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, иммунологических, биологических и биоинформатических, а также протеомный анализ. Все данные экспериментов подвергали статистической обработке. Работа была проведена на 84 штаммах чумного микроба и 7 штаммах *E. coli*. Выборка культур, принадлежащих к разным биоварам *Y pestis* subsp. *microti* представительна (73 штамма). Набор использованных методов разнообразен, современен и соответствует поставленным задачам.

Результаты собственных исследований изложены в главах с третьей по пятую. Общая схема построения исследования представляется логичной и обоснованной. На первом этапе автор разработал метод и отобрал изогенные варианты *Y. pestis* subsp. *Microti*, на втором, с помощью протеомного анализа белков, синтезированных *in vivo*, определил возможные кандидаты, ответственные за избирательную вирулентность, сконструировал изогенные нокаутные мутанты по генам, ответственным за синтез выбранных белков, провёл сравнительный анализ характеристик диких и мутантных изогенных вариантов и, наконец методом комплементации доказал корректность определения характеристик, приписанных этим белкам.

Глава 3, собственно, посвящена поиску факторов избирательной вирулентности *Y. pestis* subsp. *microti*. Используя оригинально адаптированную методику тестикулярных пассажей на морских свинках, диссертанту удалось отобрать две субкультуры штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica* вирулентность которых при подкожном заражении морских свинок достоверно не отличалась от вирулентности штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis*. Для воспроизведения изменений, происходящих при попадании возбудителя чумы в организм теплокровного хозяина, диссертант предложила и использовала метод культивирования бактерий в перитонеальной полости морских свинок в камерах из диализной мембраны, выполнила эксперименты в условиях BSL-3 по внутрибрюшинному культивированию двух субкультур (исходной и после тестикулярных пассажей) каждого из штаммов. После сравнительного анализа протеомов субкультур штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, принципиально отличающихся по вирулентности для морских свинок, методом высокоразрешающего двумерного электрофореза удалось выявить изменение уровня продукции нескольких белков штаммов *Y. pestis* subsp. *microti*, которые были затем идентифицированы методом масс-спектрометрии. Все полученные Е.А. Красильниковой результаты логично обсуждены в сопоставлении с данными из публикаций других авторов.

В главе 4, представлены результаты экспериментов по проведению нокаутного мутагенеза генов, кодирующих белки HtpG, GlnA, GlnALG и MetQ для определения их вклада в патогенез чумы. При проведении биоинформатического анализа регионов, кодирующих синтез белка теплового шока HtpG, глутаминсинтетазы GlnA и двухкомпонентной регуляторной системы GlnLG, ABC-транспортера метионина MetQ и фруктозо-бисфосфатаальдозазы Fba, Екатерина Александровна показала высокую консервативность их аминокислотных последовательностей внутри вида *Y. pestis* и рода *Yersinia*. Нокаутный мутагенез показал, что утрата способности продуцировать HtpG и GlnA не влияет на вирулентность *Y. pestis* для мышей и морских свинок, однако мутантный штамм с сочетанной делецией гена глутаминсинтетазы (*glnA*) и генов двухкомпонентной регуляторной системы азота (*glnLG*) значительно снижал вирулентность. В ходе оценки иммуногенности установлено, что после однократной подкожной иммунизации мышей и морских свинок аттенуированный штамм *Y. pestis* 231Δ*glnALG* обеспечивал защиту животных при последующем подкожном введении значительных доз вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Нокаут гена *metQ* привел к аттенуации ауксотрофного по метионину штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 как для мышей, так и для морских свинок, а проведенная транс-комплиментация восстанавливала

вирулентность. Определена локализация белка MetQ в клетке чумного микроба. Связь ABC-транспортера метионина с вирулентностью чумного микроба и выживанием патогена в организме хозяина, его локализация в клеточной стенке бактерии и отсутствие гомологичных белков в клетках млекопитающих, делает метионин-связывающий транспортер MetQ потенциальной мишенью для новых препаратов для лечения и иммунопрофилактики чумы. Автор справедливо считает целесообразным продолжение изучения сконструированного в ходе диссертационной работы штамма 231Δ*glnALG* в качестве кандидата на живую вакцину против возбудителя чумы. Тогда как метионин-связывающий белок MetQ может быть потенциальной молекулярной мишенью при разработке новых препаратов для лечения заболевания.

В главе 5 приведены данные по оценке вклада продуктов генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* в иммуногенез чумы, т.к. поиск дополнительных протективных антигенов чумного микроба продолжает сохранять свою актуальность. Для этого проведено клонирование генов *htpG*, *glnA*, *fba* и *metQ* в составе векторной плазмиды pET32b(+) в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3). Выделены и очищены рекомбинантные белки в препаративных количествах, а также определена их иммунологическая активность по уровню продукции специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови мышей. Для трех белков Fba, MetQ и HtpG показана способность стимулировать продукцию специфических антител после двукратной подкожной иммунизации беспородных мышей. Однако ни один из белков не проявлял протективной активности при последующем подкожном заражении вирулентным штаммом чумного микроба. Такой активностью не обладали даже белки, иммунизация которыми мышей формировала выраженный гуморальный ответ. Этот результат подтверждает многочисленные сведения о наличии иммуногенности и отсутствии противобактериальной защитной активности компонент у ряда бесклеточных субъединичных вакцин.

В «Заключении» подведены итоги работы, приведены обобщающие материалы по главам «Собственных исследований».

Семь выводов диссертации основываются на представленном экспериментальном материале, они аргументированы, являются логическим завершением проделанной работы и не вызывают сомнений в их достоверности. Все вынесенные на защиту положения нашли отражение в соответствующих публикациях.

Диссертация Е.А. Красильниковой носит завершённый характер, хорошо оформлена и иллюстрирована. Автореферат полностью отражает основные материалы диссертации, хорошо иллюстрирован. Представленные экспериментальные данные вполне убедительны и критических возражений по существу рецензируемой работы нет.

Вопросы

Положительно оценивая работу в целом и подчёркивая её новизну и значимость для науки и практики, в порядке дискуссии хотелось бы получить ответы на следующие вопросы, которые возникли при анализе материалов диссертационной работы:

1. Почему Вы пишете только о двух подвидах чумного микроба, а в публикациях сотрудников РосНИПЧИ «Микроб» вместо одного неосновного подвида *microti* фигурируют сразу несколько неосновных подвидов?

2. Почему мутагенез бактерий вакцинного и вирулентного штаммов проводили разными методами.

3. Каким основным требованиям, с Вашей точки зрения, должна удовлетворять «идеальная» чумная вакцина?

Заключение

Все изложенное свидетельствует о том, что диссертация Е.А. Красильниковой выполнена на высоком методическом уровне, является завершенной научно-квалификационной работой, в основу которой положен большой фактический материал по разработке перспективного направления – поиску молекулярных основ «избирательной» вирулентности штаммов *Y. pestis* subsp. *microti* и изучению вклада найденных белков в патогенез и иммуногенез чумы. Соответствие рецензируемого исследования паспорту специальности 03.02.03 «микробиология» (пунктам 3,4,5) обосновано целью, задачами, полученными результатами, положениями, выносимыми на защиту и выводами.

В целом, по значимости и актуальности поставленной проблемы, уровню методического подхода к её разрешению, теоретическому и научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует критериям пп. 9, 10, 11 и 13 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., в редакции постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г. и № 1168 от 01.10.2018 г., а её автор – Екатерина Александровна Красильникова - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОППОНЕНТ

Руководитель лаборатории генетики бактерий, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор биологических наук

Геннадий Иванович Каратаев

Адрес: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 8(499)193-30-01, karataevgi@rambler.ru

Подпись д.б.н., руководителя лаборатории генетики бактерий, ведущего научного сотрудника Геннадия Ивановича Каратаева заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

кандидат биологических наук



Людмила Кондратьевна Кожевникова