ОТЗЫВ
на автореферат диссертационной работы
Легоцкого Сергея Александровича «Получение, изучение свойств, стабилизация рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394 и разработка эффективного лизиса грамотрицательных бактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Работа Сергея Александровича Легоцкого посвящена получению нового рекомбинантного фермента – бактериолизина бактериофага S-394, способного эффективно лизировать клетки грамотрицательных бактерий. Изменчивость микроорганизмов и приобретение устойчивости к терапевтическим дозам традиционных антибиотиков ставит разработку новых подходов к противомикробной терапии в ряд первоочередных задач, от решения которых зависит эпидемиологическая безопасность. Поэтому рецензируемая работа представляется исключительно актуальной.

Отправной точкой настоящего исследования явилось открытие бактериофага S-394 в промышленных сточных водах. При этом перед диссертантом стояли задачи клонирования лизина, выделяемого данным штаммом, налаживание методики его наработки и выделения, исследование его ферментативной активности и разработка подходов к стабилизации белка по отношению к необратимой термоинактивации.

К несомненным достоинствам рецензируемой диссертации следует отнести основательность и высочайший уровень использованной методологии. На первом этапе автор проводит секвенирование гена бактериолизина фага S-394 и проводит анализ гомологии полученной последовательности с лизинами из других источников. На основании этих данных делаются выводы о консервативных участках в молекуле фермента, а также о том, что он является пептидазой, расщеаляющей пептидную связь с молекуле пептидогликана. Затем автор проводит клонирование гена бактериолизина S-394 в плазмидном векторе, уже содержащем гексагистидиновую последовательность, и подтверждает структуру получившегося продукта секвенированием гена. На следующем этапе автором были подобраны условия культивирования штамма-продуцента и стимуляции гена индуктором ИПТГ, а также налажены способы выделения белка. Высокий уровень генно-инженерной части работы свидетельствует о профессионализме чрезвычайном упорстве соискателя в достижении поставленной цели.

Оказалось, что полученный ферментный препарат проявляет бактериолитическую активность лишь по отношению к грамотрицательным бактериям, причем для проявления активности снаружи клеток требуется присутствие соединений, нарушающих упаковку молекул во внешней стенке бактерий. Основательность подхода и упорство экспериментатора не оставили автора и на этой стадии выполнения работы. Им были

исследованы такие эффекторы как ЭДТА, поликатионы (полилизин и полиаргинин варьируемой степени полимеризации, сополимеры полилизина с полиэтиленоксидом) катионные олигопепетиды PGLa и магаинин из шпорцевой лягушки. Оказалось, что наибольшую активность проявили полиаргинин и катионный пепетид PGLa, которые при малой концентрации сильно повышали бактериолитическую активность фермента.

На последнем этапе работы автором были проведены исследования стабильности фермента по отношению к необратимой термоинактивации. Были исследованы такие подходы из арсенала известных способов стабилизации ферментов, как повышенная ионная сила, полиолы и углеводы, катионные блок-иономеры. В ходе работы были подобраны условия, позволяющие довести время, в течение которого фермент сохранял свою активность, до 4 месяцев.

В качестве пожелания можно отметить, что для применения бактериального лизина для уничтожения патогенных микроорганизмов необходимо исследовать его собственную цитотоксичность на культурах человеческих клеток. Кроме того необходимо продумать подходы к понижению иммуногенности и аллергенности данного белка.

На мой взгляд, разработанные автором подходы к получению рекомбинантного эндолизина бактериофага S-394 и лизису грамотрицательных бактерий под действием этого фермента являются важным вкладом в развитие биохимии и биотехнологии. По всем параметрам работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (включая бионанотехнологии), а ее автор, Легоцкий Сергей Александрович, заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата химических наук.

В.н.с. лаборатории функциональных полимеров
и полимерных материалов кафедры ВМС
Химического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова, д.х.н.

11.11.2016 Н.С. Мелик-Нубаров

melik.nubarov@genebee.msu.ru
Москва, Ленинские горы 1, стр 40.
(495)939-55-83

Личную подпись Мелик-Нубарова Н.С.
ЗАВЕРЯЮ:
Нач. отдела делопроизводства
химического факультета
Ларина