

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Терехова Станислава Сергеевича

«Ультравысокопроизводительный скрининг клеточных библиотек с использованием технологии микрофлюидики для поиска биокаталитической и антимикробной активности»,

представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности биоорганическая химия-02.00.10

Диссертационная работа Терехова Станислава Сергеевича посвящена исследованиям, направленным на создание универсальной ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы для скрининга различных типов биокаталитической и биологической активности. Несомненность актуальности такого исследования определяет то, что несмотря на колоссальные успехи методов молекулярного моделирования, эти подходы не являются универсальными и требуют дальнейших усовершенствований. К настоящему времени разработано много комбинаций методов компьютерного моделирования и успешного скрининга лекарственных препаратов. Однако, многие разработанные подходы не универсальны и требуют больших расходов используемых материалов. Особенностью настоящего этапа в развитии методов анализа является тенденция к переходу биотехнологических подходов к минимизации оборудования, уменьшению расходов на используемые реагенты с использованием технологии “лаборатории-на-чипе”, основанной на современных успехах в области микрофлюидики. Именно разработке таких подходов для отбора функционально активных клонов с использованием принципа микрофлюидной компартментализации, а также применения данной платформы для анализа направленной эволюции ферментов и поиска микроорганизмов, демонстрирующих антибиотическую активность по отношению к патогенным бактериям *Staphylococcus aureus* посвящена данная работа.

Диссертационная работа Терехова С. С. состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Список литературы включает 237 наименований. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 57 рисунков. Приложение к диссертации, содержащее дополнительный материал, уточняющий некоторые данные, занимает 10 страниц.

Во “Введении” к диссертационной работе автором обоснована актуальность работы и кратко сформулированы ее задачи.

Литературный обзор в целом дает достаточно полную картину состояния исследований по разработке и использованию современных методов скрининга различных соединений с каталитической и другими биологическими активностями. Он включает данные о классических эмульсионных методах скрининга активностей, микрофлюидных технологий для генерации монодисперсных эмульсий и инкапсуляции единичных живых клеток и организмов, данные о использовании рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека в качестве антидота при отравлении фосфорорганическими токсинами и о скрининге компонентов с антибиотической активностью.

Глава “Экспериментальная часть” написана ясным, четким языком на 32 страницах. Описаны все использованные методы, их необычно много, всего приведено 59 методик. Все методики описаны так, что эксперименты могут быть воспроизведены.

Глава «Результаты и обсуждение» в основном направлена на описание подходов к созданию микрофлюидной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антибактериальной активности в каплях микрофлюидной двойной эмульсии.

По сравнению с предыдущими, ранее опубликованными работами, автором предложена в достаточной мере новая платформа, основанная на микрофлюидной генерации капель, обеспечивающей их монодисперсность. Монодисперсность эмульсии, обеспечивает примерно одинаковые концентрации реагентов, а также близкие и/или даже одинаковые условия проведения реакций в каплях. Это несомненное улучшение методики, поскольку позволяет многократно снизить соотношение сигнал/шум в процессе скрининга, а также повысить чувствительность и специфичность отбора искомым мишеней и взаимодействий между ними. Микрофлюидная генерация эмульсии, как показал автор, позволяет обеспечить более мягкие условия инкапсуляции, что позволяет использовать этот подход для живых клеток, а контролируемые условия генерации эмульсии позволяют заключать в ее каплях заданное количество клеток.

Для демонстрации универсальности платформы автором были использованы три различных фермента имеющие фосфодиэстеразную (ДНКазы I), протеазную (энтеропептидаза – ЭК) и эстеразную (бутирилхолинэстераза – БУХЭ) активность.

Для проведения этих экспериментов были подобраны специальные условия и субстраты, дающие продукты с различными характеристиками флуоресценции. Было показано, что полученные микрофлюидные эмульсии характеризуются высокой монодисперсностью, а накопление продуктов реакции происходит исключительно в каплях, несущих активные дрожжевые клетки. Произведен отбор популяции капель, обладающих высоким уровнем флуоресценции, которые высевались на чашки; происходил рост дрожжевых колоний. Это позволило найти клетки, обогащенные по каждому из анализируемых ферментов. Была проведена оценка необходимого числа раундов селекции и относительной активности ферментов в клетках для максимально эффективного отбора. Было показано, что за 1 раунд скрининга возможен даже в том случае, если популяция активных клеток составляет менее 0,1%, а в случае высокоактивных ферментов типа ДНКазы, ЭК и БуХЭ дикого типа, доля активных клеток может составлять менее 0,001%.

С помощью этого эффективного подхода был проведен отбор мутантов бутирилхолинэстеразы, устойчивых к действию фосфорорганических токсинов; параоксону или кумариновому аналогу зомана. В случае РОХ были *de novo* созданы мутанты БуХЭ с новой активностью, способные катализировать гидролиз фосфорорганических токсинов.

Достигнуто улучшение фармакокинетических характеристик рчБуХЭ за счет ее продукции исключительно в виде тетрамера. Для этого проведено создание генетических конструкций нового поколения для высокоэффективной продукции 4рчБуХЭ. Автором проведено изучение фармакокинетических характеристик и профиля биораспределения 4рчБуХЭ в различных органах мышей, а также влияния химического полисиалирования фермента на его характеристики, включая изучение профиля биодegradации 4рчБуХЭ *in vivo*. Полученные данные несомненно важны и могут иметь интересное применение в научных исследованиях и медицинской практике.

Автором проделана большая работа по созданию модельной системы для изучения попарных взаимодействий микроорганизмов. Для изучения попарных межклеточных взаимодействий микроорганизмов в каплях была разработана простая модельная система, имитирующая взаимодействия между тремя различными видами бактерий, игравших роль “жертвы”, “убийцы” и “сожителя”. Разработанная схема была использована для отбора бактерий-продуцентов антибиотиков, ингибирующих рост патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*. Штамм *S. aureus*,

конститутивно продуцирующий зеленый флуоресцентный белок-репортер, был использован в качестве “жертвы”. Бактерии *Streptomyces venezuelae*, продуцирующие антибиотик хромфеникол и ингибирующие рост *S. aureus*, были выбраны в качестве “убийцы”. Для того чтобы показать, что возможности данной платформы не ограничены использованием именно клеток *S. aureus* в качестве жертвы, были использованы клетки *E. coli*. В целом полученные данные позволили оценить ряд особенностей и характеристик разных бактерий для изучения попарных взаимодействий микроорганизмов.

Поскольку несмотря на высокую патогенность *S. aureus* инфекции этими бактериями достаточно редки, автор предположил возможность наличия неких пока неизвестных естественных эффекторов микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*. Автор провел скрининг бактерий, ингибирующих рост *S. aureus*, среди представителей микробиоты ротовой полости.

С помощью секвенирования 16S рРНК были выявлены две субпопуляции бактерий-ингибиторов, отобранных с различной эффективностью. Бактерии родов *Propionibacterium*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, и *Escherichia* обладали наивысшим уровнем обогащения, в то время как *Corynebacterium*, *Janthinobacterium*, *Serratia*, *Enterobacter* и *Streptococcus* были также достоверно обогащены с более низкой степенью обогащения. *Streptococcus* представляли при этом популяцию наиболее распространенных ингибиторов *S. aureus* среди представителей микробиоты ротовой полости. Отобранные клоны в процессе роста продуцировали в ростовую среду метаболиты, ингибирующие рост *S. aureus*. Использование микрофлюидной платформы позволило отобрать штамм *Pseudomonas aeruginosa*, полностью ингибирующий рост *S. aureus* в культуре даже при попадании единичных клеток *P. aeruginosa*. С помощью масс-спектрометрии было установлено, что основными действующими веществами, являются пиоцианин, феназин-1-карбоновая кислота и 2-гептил-4-гидроксихинолин N-оксид.

Данная работа, несомненно, отличается новизной и значимостью полученных результатов как для понимания теоретических основ расширенного скрининга самых разных биокаталитических и антибактериальных активностей, изучения взаимодействия ферментов с субстратами и клетками, а также и для возможного расширенного использования полученных результатов в практических целях.

В данной работе впервые разработана многоплановая и универсальная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и

антибактериальной активности в каплях двойной микрофлюидной эмульсии. Разработанный подход позволил найти новые мутанты бутирилхолинэстеразы человека, имеющие повышенную устойчивость к инаktivации под действием фосфорорганических токсинов (ФОТ) и обладающих способностью гидролизовать ФОТ. Автором впервые получены экспрессионные вектора для продукции тетрамерной бутирилхолинэстеразы, период полувыведения которой примерно в 10 раз лучше, чем для одномерного фермента. Используя модельную систему, основанную на кокультивации бактерий в каплях, был осуществлен скрининг индивидуальных попарных клеточных взаимодействий. Разработанный подход позволил идентифицировать компоненты микробиоты ротовой полости, ингибирующих рост *S. aureus*. С помощью метаболомного анализа показано, что *P. aeruginosa* эффективно ингибирует рост *S. aureus* за счет продукции вторичных метаболитов, обладающих синергическим действием, направленным на индукцию окислительного стресса.

Работа написана хорошим языком, но к недостаткам работы следует отнести некоторые погрешности в ее оформлении. Основная часть работы (до списка литературы занимает 136 страниц). В то же время, автором допущен неоправданный пропуск вплоть до половины большого числа страниц (14,19, 30,33, 35, 79, 85, 90, 98, 105, 109, 111, 117, 118, 120, 122, 129). Перед большими по размеру рисунками часть страниц остаются пустыми. Однако, это пространство может быть заполнено текстом, который следует после рисунка, а рисунок поместить в начале следующей страницы. Кроме того, подписи к некоторым рисункам расположены на двух страницах (например, рис. 1, 11, 12 и т. д.). Это очень затрудняет анализ данных рисунков. С одной стороны, рисунок можно было разметить на следующей странице. Кроме того, подписи к рисункам можно было уменьшить и дать не через 1,5, а через один интервал. Все подписи к рисункам почему-то имеют центральное форматирование и не используются переносы слов, что тоже улучшило бы оформление работы.

В работе есть несколько результатов, имеющих самостоятельное значение. Однако автор по заголовком “Выводы” дает один вывод на полторы страницы.

Тем не менее, эти замечания не умаляют достоинств диссертационной работы. Работа Терехова Станислава Сергеевича выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работам по данному вопросу.

Данные работы Терехова С. С. могут иметь важное значение, как для теоретического понимания новых подходов в поиске взаимодействующих в клетках ферментов с субстратами и эффекторами, взаимодействий различных клеток между собой и с самыми разными соединениями. Результаты могут в будущем иметь важное значение для практических целей, включая получение новых ферментов, новых микроорганизмов с особыми свойствами и для применения в медицине для самых разных целей.

Работа Терехова Станислава Сергеевича является завершенным трудом. Результаты работы могут быть использованы в очень большом числе институтов биохимического, молекулярно-биологического, биологического и медицинского профиля, как в России, так и за рубежом.

По актуальности темы, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа Терехова Станислава Сергеевича соответствует требованиям, изложенным в п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности «Биоорганическая химия» – 02.00.10.

Профессор, доктор химических наук
Зав. лаборатории ферментов репарации
ИХБФМ СО РАН Г. А. Невинский
15.11.2016



- Невинский Георгий Александрович
- Новосибирск 630090, проспект Лаврентьева, 8
- Тел. +7-383-363-5126,
- nevinsky@niboch.nsc.ru
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН
- доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией