

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Новотоцкой-Власовой Ксении Александровны «Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых осадков», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Исследование функционирования геномов микроорганизмов-экстремофилов (например, термофилов, психрофилов, алкалифилы, ацидофилы и т.д.) в настоящее время является одной из наиболее бурно развивающихся областей микробиологии и молекулярной биологии. При этом большое внимание уделяется не только физиологическим процессам, проявляющимся в условиях культивирования данных клеток, но и изучению причин выявленных особенностей в функционировании микроорганизма. Понимание особенностей метаболических процессов, протекающих в данных бактериях, и их сравнение между собой может обеспечить не только появление новых данных о механизмах устойчивости этих микроорганизмов в экстремальных (непермиссивных) условиях, но выявить особенности в строении ключевых белков (ферментов), обеспечивающих их выживание и размножение. Именно поэтому для решения поставленных задач по полноформатному исследованию новых микроорганизмов (бактерий) обязательно привлекаются исследователи различных областей знаний – генетика, микробиология, физиология микроорганизмов, молекулярная генетика и биология, геномная инженерия, биоинформатика. При этом большое внимание уделяется не только физиологическим процессам, проявляющимся в условиях культивирования данных клеток, но и изучению причин (механизмов) выявленных особенностей в функционировании микроорганизма. Вышеуказанное во многом и определяет своевременность и актуальность проведенного в диссертационной работе исследования, несущего все признаки фундаментальности.

Важно отметить, что весь экспериментальный материал диссертационной работы базировался на созданной, с участием Новотоцкой-Власовой К.А., коллекции штаммов микроорганизмов из различных криопэгов полуострова Ямал, Аляски, тундровой зоны Колымской низменности. Именно из чистых культур, полученных в предварительных экспериментах, и была создана рабочая коллекция, состоящая из 44 штаммов микроорганизмов способных к росту при высоких концентрациях хлористого натрия и низких температурах. Полученная коллекция достаточно хорошо и полно охарактеризована с учетом планируемого исследования: проведен скрининг на наличие липолитической активности у выделенных бактерий, осуществлен морфологический и филогенетический анализ культур, давших положительный результат на этот скрининг. Эта часть работы по своему объему и тщательности проведения свидетельствует о том, что автор является высококвалифицированным микробиологом.

В качестве объекта для более детального исследования Новотоцкая-Власова К.А. выбрала штамм психроактивной бактерии *P. cryohalolentis* K5^T, выделенной из арктического криопэга. Следует отметить, что автор направила свое внимание, прежде всего, на исследование спектра липолитической активности у этого микроорганизма. Такое повышенное внимание обусловлено тем, что именно эта ферментативная система во многом может обеспечивать изменение текучести мембраны бактерии, предопределяя ее выживаемость в условиях холодового стресса. Экспериментально было подтверждено наличие как внутри-, так и внеклеточной липолитической активности у *P. cryohalolentis* на различных стадиях роста культуры и обнаружено, что внутриклеточная активность значительно выше внеклеточной. Этот факт мог быть результатом биосинтеза в данной гаммапротеобактерии в основном внутриклеточных липолитических ферментов.

Наличие в базе данных полной геномной последовательности бактерии *P. cryohalolentis* K5^T позволило автору осуществить поиск и идентификацию генов потенциальных липолитических ферментов этого микроорганизма для их последующего клонирования. В этой части работы Новотоцкая-Власова К.А. также проявила достаточную уверенность в использовании методов биоинформатики и, в конечном итоге, не только идентифицировала целевые гены, но и предложила гипотетическую модель функционирования предполагаемой липолитической системы у исследуемой бактерии.

Полученные вышеобозначенные данные позволили автору уверенно перейти непосредственно к клонированию выбранных генов, получению соответствующих рекомбинантных белков и изучению их свойств. Данная часть работы является также объемной и немаловажной для всего исследования в рамках диссертационной работы.

Практически все запланированные в работе к исследованию белки (EstPc, Lip1Pc и его искусственные по N-концу мутанты, Lip2Pc, шаперон LifPc, а также его укороченные варианты) были получены, очищены, рефолдированы и полностью охарактеризованы в рамках поставленной задачи. Было экспериментально показано, что EstPc является относительно термостабильной эстеразой, проявляющей высокую активность низких температурах, Lip1Pc - липазой, эффективно утилизирующей субстраты с длиной углеводородной цепи C10-C12 при пониженной температуре, в отличие от Lip2Pc, представляющим собой холодоактивный липолитический фермент, способный использовать субстраты с длиной углеводородной цепи C14-C16 и обладающий относительно высокой термостабильностью.

Изучение свойства мутантных белков Lip1Pc (ND1 и ND2) показало, что по сравнению с ферментом «дикого типа» активность ND1 и ND2 при использовании *n*-НФП (C16) в качестве субстрата снижалась на 13 и 7%, соответственно, но при этом мутантные формы показали увеличение активности на 20% по отношению к *n*-НФД (C10), то есть субстратная специфичность мутантных липаз стала более узкой. Полученные результаты указывают на участие N-концевых аминокислотных структур в формировании субстратного туннеля у данного фермента, относящегося к семейству HSL, а также возможным ограничением доступа субстрата к активному центру белка

Интересным является и подход к рефолдингу полипептида Lip2Pc с использованием шаперона LifPc. Новотоцкой-Власовой К.А. продемонстрировано, что укороченный вариант этого рекомбинантного белка-шаперона LifPcd62 успешно осуществляет свою функцию фолдинга рекомбинантного белка.

Следует отметить, что автором отработаны практически все стадии биотехнологического получения рекомбинантных белков, обладающих липолитической активностью, созданы эффективные штаммы-продуценты этих ферментов. Именно этот факт придает проведенному исследованию высокую практическую значимость, т.к. полученные липолитические ферменты могут найти самое широкое использование в тонком химическом синтезе, пищевой и легкой промышленности, а также при биоремедиации сточных вод и почв.

В работе, по моему мнению, имеется ряд неточностей, которые необходимо отметить:

1. использование буфера Tris-HCl, хотя и допускается в целом ряде работ, не может быть признано правомерным при исследовании оптимального температурного значения, а также термостабильности фермента, т.к. данный буфер является в значительной степени температуро-зависимым;
2. выявление сигнального пептида у белка EstPc сразу же предполагает выяснение его функциональной активности – транслокации про-белка в периплазматическое пространство клеток, что в работе не было продемонстрировано. Более того, не до конца выяснена ситуация с явлением отсутствия экспрессии соответствующего гена в клетках *E. coli*. Предположение, что «вероятной причиной отсутствия или крайне низкого уровня экспрессии полноразмерного гена *estPc* может быть его неправильная локализация в

клетках *E. coli*» не может быть признано окончательным, тем более на фоне наличия биосинтеза белка с deletированным сигнальным пептидом;

3. в тексте допускается неточность в выражении «клонировали полноразмерный ген», хотя, скорее всего, клонировали фрагмент ДНК, кодирующий структурную часть гена (т.е., сам полипептид);

В заключение, хотелось бы отметить, что работа Новотоцкой-Власовой К.А. производит самое благоприятное впечатление как новизной полученных результатов, так и логичностью построения самого исследования. В работе использован широкий набор научных подходов при проведении экспериментальной работы. Следует признать, что данная диссертационная работа является важным шагом в изучении функционирования генома психротрофных микроорганизмов. Кроме того, хотелось бы отметить, что каждый из элементов рассматриваемого исследования несет выраженный характер новизны и приоритетности, что нашло свое отражение в авторских научных публикациях, патенте, а также материалах отечественных и международных конференций. Работа несет все признаки фундаментальности, а вытекающие из экспериментов выводы позволяют развивать дальнейшее практическое их применение. Именно эта сбалансированность, по моему мнению, и является важнейшим признаком современной зрелой диссертационной работы.

Выводы полностью соответствуют изложенному в автореферате экспериментальному материалу.

Судя по автореферату и представленным в нем научным результатам, работа Новотоцкой-Власовой К.А. «Холодоактивные липолитические ферменты психротрофных микроорганизмов, выделенных из многолетнемерзлых осадков», в полной мере соответствует самым высоким требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Считаю, что Новотоцкая-Власова Ксения Александровна является высококвалифицированным исследователем и, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Главный научный
сотрудник лаборатории «Молекулярной инженерии»
ФГБУН ИНБИ им. А.Н. Баха РАН,
доктор биологических наук, профессор

Вейко Владимир Петрович

Подпись Вейко В.П.
УДОСТОВЕРЯЮ Ученый секретарь
ФГБУН ИНБИ им. А.Н. Баха РАН,
кандидат биологических наук



Орловский Александр Федорович

18 мая 2015г.

119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им.А.Н. Баха Российской Академии Наук

Телефон: (495)660-34-30.

E-mail: vladveiko@yahoo.com