

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Васиной Дарьи Владимировны на диссертацию Трубициной Любови Игоревны «**Двухдоменные лакказы бактерий рода *Streptomyces*: клонирование, экспрессия, характеристика ферментов**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Диссертационная работа Л.И. Трубициной посвящена поиску и характеристике новых медьсодержащих оксидаз бактериального происхождения, представляющих собой двухдоменные лакказы. Востребованность лакказ в различных биотехнологических отраслях, а также в процессах биоремедиации обуславливает актуальность проводимого исследования. Выработанные на данный момент требования к применяемым в промышленности ферментам заставляют исследователей постоянно искать новые лакказы и их источники, удовлетворяющие требованиям производства. В этом плане более стабильные 2д бактериальные лакказы могут стать востребованной альтернативой грибным лакказам. Тем не менее, отсутствие информации о биохимических, каталитических и структурных свойствах ферментов в значительной мере ограничивает их промышленное применение.

Актуальность темы диссертации

Сегодня в развитых странах мира биотехнологии прочно заняли лидирующее положение практически во всех отраслях хозяйственной деятельности человека. Преимущества биотехнологических процессов очевидны - экологическая безопасность и эффективность. Одним из основных направлений промышленной биотехнологии является применение в производственных процессах природных и генетически модифицированных катализаторов – ферментов. По каталитическим свойствам, субстратной специфичности и биотехнологическому потенциалу лакказа – практически идеальный катализатор для «зеленой химии». При применении лакказ в биотехнологиях используют такие их преимущества, как высокий окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), широкую субстратную специфичность, стабильность, отсутствие необходимости использования дорогих кофакторов и агрессивных косубстратов. Двухдоменные бактериальные лакказы были открыты сравнительно недавно и представляют большой интерес для биотехнологии. Несмотря на то, что они уступают по величине ОВП широко изучаемым грибным лакказам, бактериальные ферменты обладают рядом преимуществ: они способны эффективно работать при нейтральных значениях рН, обладают низкой

чувствительностью к ингибиторам и высоким температурам. Все это определяет необходимость поиска и изучения свойств двухдоменных бактериальных лакказ.

Оправданным представляется и выбор объектов исследований. Род *Streptomyces* – один из наиболее изучаемых родов актиномицетов, в частности, из-за способности представителей этого рода эффективно деградировать природные полимеры (например лигнин), а также наличия в общедоступных базах данных секвенированных геномов этих микроорганизмов. Более того, как показал анализ научной литературы, проведенный Л.И. Трубициной, большинство 2д лакказ были выделены именно из бактерий рода *Streptomyces*. Тем не менее, до сих пор накоплено крайне мало информации по характеристике этих ферментов.

Таким образом, актуальность проведения исследования двухдоменных лакказ бактерий рода *Streptomyces* не вызывает сомнений.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

На основании осуществленной работы автором сформулировано 7 выводов. Все они соответствуют цели и поставленным задачам, отражают полученные экспериментальные результаты по изучению структурной организации двухдоменных бактериальных лакказ и их функциональной характеристике на примере рода *Streptomyces*.

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждена значительным экспериментальным материалом, полученным с использованием современных методов исследований и не вызывает сомнений.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной. В ходе работы удалось идентифицировать и клонировать три гена двухдоменных лакказ. Две новые 2д лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993, а также ранее известный белок SLAC из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac1709, были экспрессированы в гетерологической системе и изучены. Причем, одна из охарактеризованных 2д лакказ (Ac-629) обладала значительной термостабильностью. В работе впервые показана устойчивость 2д лакказ к таким ингибиторам как азид и фторид натрия, а также выдвинуто предположение, определяющее эту устойчивость. Для объяснения данного явления впервые были получены пространственные структуры новых бактериальных лакказ, в том числе в присутствии и отсутствии азидата натрия. Таким образом, получен комплекс новых данных об особенностях 2д лакказ у бактерий рода *Streptomyces*.

Исследование выполнено на высоком методическом уровне с применением разнообразных подходов, соответствующих поставленным задачам и позволяющих получить значимые результаты для характеристики молекулярных, физико-химических и

каталитических свойств лакказ рода *Streptomyces*, их структурной организации. Используемые подходы (скрининг штаммов-продуцентов медьсодержащих оксидаз, гетерологичная экспрессия генов, получение чистых ферментов, пригодных для характеристики, кристаллизация белков) широко применяются в мировой практике, они давно подтвердили свою результативность, что позволяет соотносить данные, полученные Л.И. Трубициной с данными других научных групп.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

Важное **практическое** значение работы определяется проведенной биохимической характеристикой полученных ферментов, а также исследованиями по поиску медиаторов лакказ и подбору условий деградации синтетических красителей с помощью лакказа-медиаторной системы. В ходе исследований для 2д лакказ было показано, что они обладают совокупностью свойств, необходимых в биотехнологических процессах (высокой термостабильностью, устойчивостью и проч.). Более того, автору в ходе проведения экспериментов удалось добиться повышения реакционной способности ферментов за счет применения лакказа-медиаторной системы, что, безусловно, является важным условием использования лакказ. Способ получения новой рекомбинантной лакказы *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 был защищен патентом.

Трубициной Л.И. получены результаты, имеющие **фундаментальное** значение для понимания механизмов устойчивости ферментов к действию ингибиторов. В дальнейшем, они будут полезны при разработке методики скрининга ферментов для конкретных промышленных процессов. В ходе кристаллизации белков было показано, что для формирования крупных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа у разных 2д лакказ имеет значение сигнальный пептид в аминокислотной последовательности рекомбинантного белка. Эти данные могут служить основой при разработке стратегии кристаллизации белков 2д лакказ.

Полученные данные представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков, работающих в различных областях биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии.

3. Содержание диссертации

Диссертационная работа Л.И. Трубициной включает в себя 8 разделов, изложена на 147 страницах, хорошо иллюстрирована 41 рисунком и содержит 22 информативные таблицы. Разделы диссертации включают: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы. При оформлении работы автор придерживался традиционной

схемы, однако собственные результаты исследований представлены в двух отдельных главах: «Результаты исследования» и «Обсуждение результатов». Список литературы обширен и включает 328 источников, при этом хорошо освещены работы последнего десятилетия.

Во введении обосновывается актуальность проблемы, формулируются цели и задачи исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы, характеризуется личный вклад диссертанта, приводятся результаты апробации полученных данных. Задачи исследования сформулированы четко и обоснованно относительно преследуемой цели. Обзор литературы базируется на анализе большого массива научной информации по тематике работы и в полной мере описывает современное состояние в области изучения свойств и функций лакказ из разных источников. Отдельная глава обзора литературы посвящена анализу имеющихся данных о наиболее исследуемых на данный момент базидиальных лакказах. Однако основное внимание уделяется бактериальным ферментам: особенностям их строения, свойств, а также способам их получения, что немаловажно для дальнейшей постановки экспериментальной части работы и обсуждения результатов.

Диссертант убедительно доказывает необходимость проводимых исследований. В целом обзор литературы дает подробное представление о предмете исследования и демонстрирует хорошее знание современного состояния дел в области изучения лакказ, а также предоставляет возможность оценить новизну полученных данных.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны применяемые в работе методики: приведены составы сред для культивирования микроорганизмов, описаны используемые интернет-ресурсы и ПО, подробно описана методика клонирования и экспрессии генов лакказ бактерий рода *Streptomyces* и их последующая биохимическая характеристика.

Благодаря логичной постановке экспериментальной части, диссертационная работа представляет собой единое законченное исследование. На первом этапе работы, на основании биоинформатического анализа, были отобраны потенциальные штаммы-продуценты двухдоменных лакказ, клонированы и подобраны условия экспрессии генов, кодирующих 2д лакказы, получены чистые препараты трех рекомбинантных белков.

Вторая часть работы посвящена характеристике полученных ферментов. Проведенные эксперименты позволили не только исследовать кинетические и биохимические особенности 2д лакказ, но и изучить влияние ингибиторов и ионов металлов на активность рекомбинантных белков. Эти данные безусловно будут полезны при разработке технологии промышленного применения этих ферментов.

Наиболее важным результатом данной части диссертации является то, что Трубициной Л.И. удалось найти и охарактеризовать самую термостабильную из описанных на сегодняшний день 2д лакказы, а также показать, что исследуемые 2д лакказы характеризуются высокой стабильностью при щелочных значениях рН (9-11), стабильны к температурной денатурации, действию ингибиторов и ионов металлов. Изучение субстратной специфичности 2д лакказ выявило их способность окислять большой спектр соединений фенольной и нефенольной природы, но более эффективно ферменты окисляли нефенольные соединения. В результате проведенного комплексного анализа получена обширная биохимическая характеристика найденных ферментов.

Впервые получены структуры трех новых лакказ, причем не только самих белков, но и их комплексов с азидом натрия. Предположена гипотеза, что устойчивость ферментов к ингибиторам связана с особенностями строения субстратного канала 2д лакказ.

Одним из преимуществ работы является эксперимент по обесцвечиванию красителей и изучению действия лакказа-медиаторной системы. Таким образом, диссертант не только характеризует выделенные ферменты, но и предлагает возможность их практического применения.

В ходе прочтения работы и автореферата возникли отдельные замечания и пожелания:

1. Актиномицеты рода *Streptomyces* успешно применяются в качестве систем экспрессии, позволяющих добиться высокого выхода целевого продукта (например *Streptomyces lividans*). Чем обусловлен выбор именно гетерологичной системы экспрессии в *E. coli*?

2. В работе фигурируют лакказы лишь трех из 5 отобранных в начале исследования штаммов микроорганизмов. Автор объясняет это тем, что две лакказы были полностью идентичны по последовательностям (Ac-1709 и Ac-235), а для одного штамма не удалось получить ПЦР продукт с разработанными парами праймеров (Ac-831). Таких проблем можно было бы избежать на начальном этапе работы, сконструировав вырожденные, а не ген-специфичные праймеры.

3. Важной биохимической характеристикой лакказ является значение окислительно-восстановительного потенциала Т1-центра фермента. Автор в работе не приводит (не измеряет) этот показатель, однако эти данные были бы полезны. Кроме того, обесцвечивание красителей в концентрации 50 мкМ проводили в присутствии медиатора АБТС в такой же концентрации (50 мкМ). Насколько целесообразно использование фермента, для «активации» которого необходимо столько же медиатора, сколько и

деградируемого субстрата? Для масштабного коммерческого использования фермент-медиаторных систем, применяемые медиаторы должны быть доступными, нетоксичными и иметь при этом низкую стоимость. АБТС достаточно дорог, поэтому было бы целесообразно проверить более дешевые соединения-медиаторы.

4. В разделах, посвященных кристаллизации лакказ не хватает детального анализа строения активного центра ферментов и его окружения. Кроме того, на рис. 35А и 41 представлен не полный комплект ионов меди - отсутствует медь в Т2 центре. Большой интерес будет представлять сравнительный анализ двух 2д лакказ для выявления причин повышенной термостабильности одной из них (Ac-993).

К сожалению, автор подробно не обсуждает отличия в ингибирующем эффекте азидата натрия в щелочных и кислых условиях. Поскольку, в кислых условиях было показано слабое ингибирование фермента азидом натрия, сравнительный структурный анализ лакказ, полученных в комплексе с азидом в щелочных и кислых рН может также представлять интерес.

5. Разделение результатов исследований и их обсуждения несколько затрудняет восприятие диссертационной работы. При прочтении возникает много вопросов, ответы на которые содержатся далее по тексту, постоянно приходится возвращаться назад, к предыдущей главе, автору приходится повторять уже озвученный материал. Если бы была использована стандартная схема представления материалов (объединение результатов и их обсуждения), этих проблем удалось бы избежать.

Все вышеперечисленные замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств и значения работы.

4. Опубликование результатов диссертации в научной печати

Диссертация Трубициной Л.И. прошла достаточно широкую апробацию на российских и международных конференциях. Результаты и выводы работы в полном объеме представлены в печатных работах, включающих в себя 3 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Также по результатам работы получен один патент РФ.

5. Содержание автореферата

Содержание автореферата отражает основные положения диссертации и является кратким и точным изложением важных разделов диссертационной работы.

6. Заключение

В целом, можно заключить, что представленная работа имеет большое значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов биотехнологии, является добротным законченным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне.

По содержанию, актуальности выбранной темы, структуре и уровню выполнения поставленных задач, степени обоснованности выносимых на защиту положений и выводов, значительной теоретической и практической значимости диссертационная работа Трубициной Любови Игоревны «Двухдоменные лакказы бактерий рода *Streptomyces*: клонирование, экспрессия, характеристика ферментов» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Васина Дарья Владимировна

кандидат биологических наук
научный сотрудник лаборатории
молекулярных основ биотрансформаций
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
E-mail: d.v.vasina@gmail.com
Тел. +79104616500



25 мая 2017 г.