

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Трубициной Любови Игоревны «Двухдоменные лакказы бактерий рода *Streptomyces*: клонирование, экспрессия, характеристика ферментов», представленную в диссертационный совет Д 002.121.01 при ИБФМ РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Актуальность исследования

В настоящее время одной из актуальных проблем биотехнологии является поиск и исследование новых ферментов, сохраняющих активность при экстремальных условиях, например, при высокой температуре или в условиях кислых и щелочных показателях рН. В этом плане микробиота является наиболее подходящим источником поиска таких ферментов. Предметом исследования Л.И. Трубициной были необычные формы бактериальных лакказ, мономеры которых состоят только из двух доменов, в отличие от ранее известных трехдоменных лакказ, которые были обнаружены в грибах. Кроме высокой термостабильности, лакказы отличаются большим окислительным-восстановительным потенциалом, что определяет их высокую окислительную активность в отношении широкого спектра субстратов. В совокупности, такие свойства лакказ способствуют их широкому использованию в пищевой, текстильной и целлюлозно-бумажной промышленности. Кроме того, фермент используют в целях биоремедиации, для химического синтеза лекарственных препаратов, в составе моющих и косметических средств. До проведения рецензируемой работы были известны неполные характеристики всего семи двухдоменных лакказ, поэтому поиск и полная характеристика новых ферментов, соответствующих современным запросам, является актуальной задачей.

Научная новизна исследования и научно-практическая значимость результатов

В диссертационной работе из двух штаммов бактерий рода *Streptomyces* были клонированы гены двухдоменных бактериальных лакказ. Были поведены все процедуры по получению двух ферментов, проведены работы по полному исследованию их свойств. Впервые обнаружена и охарактеризована термостабильная бактериальная двухдоменная лакказа, способная сохранять активность после длительного кипячения. При этом доказана необычная устойчивость двухдоменных лакказ к азиду и фториду натрия как в щелочных, так и кислых условиях, а также сохранение их активности при нейтральном значении pH. Установлено, что для формирования крупных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа у разных двухдоменных лакказ имеет значение как наличие, так и отсутствие сигнального пептида в аминокислотной последовательности рекомбинантного белка. Кроме того, была установлена причина низкой чувствительности двухдоменных лакказ к ингибитору азиду натрия: его связывание в необычном участке активного центра и невозможность проникновения по субстратному каналу к T2/T3-центру из-за наличия отрицательно заряженных и полярных аминокислот, формирующих стенки канала.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений

В диссертационной работе Трубициной Л.И. использовались современные биохимические и методы молекулярной биологии. Это были: выделение геномной ДНК, ПЦР амплификация ДНК, очистка ПЦР-фрагментов, клонирование и экспрессия генов лакказ, очистка рекомбинантных белков с использованием хроматографий (афинной и гель-фильтрации), спектральные методы, метод кристаллизация лакказ, использование компьютерных программ и интернет-ресурсов и др. Эксперименты продуманы, результаты статистически обработаны с использованием пакета SigmaPlot. Выводы, сделанные Трубициной Л.И., полностью отражают полученные результаты и соответствуют целям и

задачам диссертационной работы. Основные результаты исследования по теме диссертации представлены в виде 3-х статей в журналах перечня ВАК, из которых две статьи опубликованы в зарубежных высокорейтинговых журналах, по материалам диссертации оформлен патент. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на международных и всероссийских конференциях, они изданы в сборнике статей и в тезисах конференций.

Диссертация оформлена в соответствии с действующими правилами ВАК. Автореферат отражает основное содержание диссертационной работы.

Анализ содержания диссертации

Диссертация имеет классическое построение и содержит несколько больших разделов: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Список цитированных работ содержит 328 источников. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ, представленный в диссертационной работе, содержит весьма подробные и исчерпывающие сведения о распространенности лакказ в биологических объектах, их эволюции, о структуре, функциональной активности и особенностях этих ферментов. Обзор очень удачно структурирован, снабжен подразделами, что делает эту часть диссертации весьма удобной для читателя. При этом хронологически подробно изложена история открытия лакказ у различных биологических объектов, включая бактерии. Описаны современные представления и гипотезы о группе белков (голубые медь содержащие белки, ГМБВ) грибов, их структурной организации и эволюции, проанализированы сведения об их субстратах и ингибиторах. Что же касается бактериальных лакказ, открытых сравнительно недавно, автор представила исчерпывающие сведения как о трехдоменных, так о двухдоменных ферментах. Для выяснения возможных свойств двухдоменных лакказ был использован метод выравнивания доступных в базах аминокислотных последовательностей охарактеризованных и неохарактеризованных двухдоменных лакказ. Были

описаны субстраты и ингибиторы лакказ, их физико-химические свойства, их функции, способы получения, каталитические свойства и область применения этих ферментов. В целом, содержание ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ демонстрирует осведомленность автора о современном состоянии науки в исследуемой проблеме.

В разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ подробно и исчерпывающе изложены сведения об использованных реактивах, приборах, компьютерных программах, интернет-ресурсах и методах исследования.

В результате проведения работы Трубицина Л.И. получила оригинальные данные о новых двухдоменных лакказ, обладающих необычными свойствами. Были клонированы и экспрессированы три двухдоменные лакказы: две новые 2д лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993, а также ранее известный белок SLAC из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709. Очищенные до гомогенного состояния лакказы имели два структурно-функциональных домена, они были активны в форме тримеров, но не проявляли активности в форме мономеров. С эволюционной точки зрения двухдоменные лакказы рассматриваются как предшественники трехдоменных лакказ, которые имеют свойства, как характерные, так и необычные для трехдоменных лакказ.

Автором была проведена физико-химическая характеристика двухдоменных лакказ. Было показано, что в отличие от трехдоменных лакказ, двухдоменные бактериальные лакказы были более стабильны при щелочных значениях рН (9-11), имели оптимум окисления нефенольных субстратов при кислых значениях рН (4,0-4,5), а фенольных субстратов при щелочных значениях рН (8,5-9,2), были более стабильны к температурной денатурации. В работе были получены характеристики самой термостабильной двухдоменной лакказы (из *S. viridochromogenes* Ac-629), в результате было установлено, что фермент сохраняет около 40% начальной активности при его кипячения в течение 1 час. Было исследовано влияние ингибиторов и

ионов металлов на активность лакказ и доказано, что двухдоменные лакказы не ингибировались азидом и фторидом натрия в щелочных условиях.

Выделенные и охарактеризованные новые двухдоменные лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были закристаллизованы без сигнального пептида. Новые белки представляли собой гомотримеры, несущие 4 атома меди на 1 молекулу белка, причем каждый мономер построен из восьми бета-структур. Анализ структуры субстратных каналов новых двухдоменных лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 показал, что он заметно уже, чем у трехдоменных грибных лакказ, что важно для понимания каталитических особенностей новых двухдоменных лакказ.

Важной частью работы по определению характеристик двухдоменных лакказ было изучение их устойчивости к ингибиторам трехдоменных лакказ грибов. Известно, что аминокислоты, формирующие стенки субстратного канала у трехдоменных лакказ, обычно представлены неполярными остатками (лейцин, пролин, фенилаланин), в отличие от этого, у двухдоменных лакказ в субстратных каналах присутствуют полярные остатки (треонин, глутамин). Этим фактом автор вполне убедительно объясняет отсутствие ингибирующего эффекта азидата натрия на активность двухдоменных лакказ в щелочных условиях. И, наконец, автор установила, что при использовании подходящего медиатора существует возможность повышения ОВП лакказ, что было наглядно продемонстрировано при обесцвечивании красителей путем использования пары лакказа-АБТС.

К рецензируемой диссертации принципиальных замечаний нет. Можно отметить, что в тексте диссертации встречаются немногочисленные опечатки и стилевые погрешности. Эти недостатки не умаляют важности полученных фундаментальных сведений и не снижают безусловно высокого качества работы.

Основные итоги сформулированы в виде семи основных выводов, которые в полной мере отражают содержание диссертационной работы и соответствуют поставленной в работе цели и задачам. Оценивая

диссертационную работу в целом, необходимо отметить, что Трубицина Л.И. в результате проведенных исследований ответила на все поставленные в работе вопросы и получила данные, которые имеют фундаментальное и практическое значение в биотехнологических процессах.

Заключение

Диссертационная работа является завершенной научно-исследовательской работой. Большой экспериментальный материал, полученный Л.И. Трубициной, содержит многочисленные находки, свидетельствующие о перспективности получения и исследования новых двухдоменных лакказ, обладающих необычными свойствами, которые могут быть использованы для биотехнологических процессов.

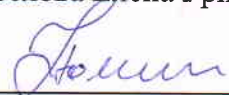
Стиль изложения диссертации хороший, она грамотно и аккуратно оформлена, автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Диссертационная работа Трубициной Любови Игоревны на тему «Двухдоменные лакказы бактерий рода *Streptomyces*: клонирование, экспрессия, характеристика ферментов» полностью отвечает требованиям для диссертации, представленной на соискание ученой степени кандидата наук, п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор, Трубицина Любовь Игоревна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник Института биофизики
клетки Российской Академии наук,
доктор биологических наук, профессор

Новоселова Елена Григорьевна

23.05.2017

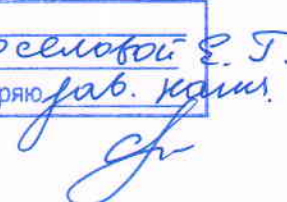


Почтовый адрес:

142290, Московская область, г. Пушкино,
ул. Институтская, д. 3; Тел: 8496739399;
e-mail: elenanov_06@mail.ru



Подпись


Новоселовой Е. Г.
достоверно зав. кадр.