

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу ЗАХАРОВОЙ Галины Сергеевны "Анионная пероксидаза табака: получение рекомбинантного фермента и его применение как компонента биоаналитических систем", представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.04 – биохимия.

Уже много лет биохимики и молекулярные биологи используют конъюгаты, содержащие пероксидазу (в основном, традиционную пероксидазу хрена) для различных биоаналитических работ, как то блот-гибридизация и другие иммуноаналитические методы. Пероксидаза хрена также широко применяется как компонент биосенсоров. Мы давно рассматриваем этот фермент как рутинный инструмент в работе, поскольку он доступен в больших количествах, относительно дешев и т.д.

В то же время другие пероксидазы, которые могли бы иметь ряд преимуществ перед традиционной пероксидазой хрена, достаточно мало изучены и практически не применяются в рутинных исследованиях. Этот пробел призвана заполнить рецензируемая диссертационная работа, посвященная всестороннему изучению анионной пероксидазы табака (ТОР). Этот фермент имеет ряд преимуществ перед пероксидазой хрена, в частности значительно более высокую активность в реакции окисления люминола, и, следовательно, обеспечивает более высокую чувствительность анализа.

До последнего времени обстоятельством, ограничивающим практическое применение ТОР в иммунологических исследованиях, являлась ее низкая доступность. Даже при выделении из генно-модифицированного табака выход фермента все равно оставался невысоким, а процедура очистки - сложной и трудоемкой. В лаборатории диссертанта был создан штамм-продуцент рекомбинантной ТОР, что позволило увеличить выход фермента до десятков и (при оптимизации условий) даже до 160 мг с литра культуральной среды. Однако по достижении столь оптимистичного результата перед разработчиками встала новая проблема - белок в основном оставался в тельцах включения, что часто бывает с рекомбинантными белками при очень высокой степени индукции.

Проблема выделения белка, сохраняющего свойства нативного, из телец включения, особенно в случае наличия у белка ферментативной активности -

является весьма сложной задачей и не имеет однозначного решения: для каждого белка условия растворения и рефолдинга приходится разрабатывать "персонально".

Хотя, с другой стороны, если такие условия отработаны, то нахождение белка в тельцах включения имеет существенное преимущество в плане выделения продукта: белок в тельцах изначально "очищен" от преобладающего количества растворимых белков, поэтому его окончательная очистка, как правило, состоит не более чем из 1-2 стадий и оказывается весьма эффективной.

Значительная часть работы Г.С. Захаровой посвящена поиску оптимальных условий рефолдинга. Автор исследовала множество вариантов, связанных с разведением белка, временем добавления и концентрацией простетической группы (гема), добавлением различных реагентов (окисленный глутатион, дитиотреитол, мочевины и др.). Также предпринимались попытки рефолдинга посредством гель-фильтрации. После изучения десятков вариантов был найден оптимальный способ рефолдинга, обеспечивающий ренатурацию активного белка с эффективностью 85%. Такая величина почти никогда не достигается при рефолдинге белков-ферментов, это практически рекорд для извлечения рекомбинантных белков из тельц включения.

Обеспечив таким образом доступность ТОР в больших количествах, автор приступила к исследованию возможностей данного фермента как инструмента для иммунологических методов анализа. Для получения конъюгатов с иммуноглобулином в данном случае непригоден метод периодатного окисления, как для пероксидазы хрена, так как рекомбинантная ТОР не гликозилирована. Поэтому был выбран способ, заключающийся в модификации аминокислотных групп фермента. По счастью, данный белок устроен так, что все модифицируемые аминокислотные группы лизина находятся достаточно далеко от активного центра фермента, что позволяло надеяться на сохранение ферментативной активности после модификации. Тем не менее, это предположение было, разумеется, экспериментально проверено. Было показано, что действительно соответствующие реагенты не влияют на каталитические свойства ТОР.

Небольшое замечание к этой части работы состоит в том, что помимо фермента дикого типа исследовалась также мутантная форма ТОР-F140Y, полученная, как сообщается, в той же лаборатории. При этом ни ссылки, ни какой-то другой информации о том, почему была выбрана для конструирования именно эта мутантная форма, а также кем и когда - в диссертации не обнаруживается.

Было показано, что в сравнении с пероксидазой хрена ТОР в качестве реагента для иммунологических исследований выигрывает по многим параметрам. Интенсивность сигнала превышает таковую с пероксидазой хрена в 2-3 раза при колориметрической детекции, и в десятки раз при детекции по хемилюминесценции, во всем изученном диапазоне концентраций. Таким образом, данная часть работы обеспечивает в недалеком будущем широкое практическое применение конъюгатов на основе ТОР, которые могут потеснить традиционные реагенты с использованием пероксидазы хрена.

В следующей, заключительной, части работы автор исследовала электрокаталитическую активность ТОР и свойства соответствующего безреагентного биосенсора. Здесь приходится отметить несколько "рваное" изложение материала. Следовало бы снабдить эту главу каким-то более подробным предисловием, обоснованием, поскольку ее содержание достаточно далеко отстоит от всех предыдущих частей диссертации, и не совсем понятно, почему вдруг автор занялась биосенсорами. В этой части работы подробно исследуется эффективность работы биосенсоров в зависимости от метода иммобилизации (физический метод, который использовался ранее, и две разновидности химической модификации). Эти методы сравниваются между собой, но при прочтении явно не хватает сравнения с аналогичными исследованиями пероксидазы хрена (если таковые исследования имели место), либо необходима информация о том, что такие методы для пероксидазы хрена не исследовались и не применялись. Иначе получается, что большая часть работы построена на выявлении преимуществ ТОР перед пероксидазой хрена, а в заключительной части способы иммобилизации ТОР просто сравниваются между собой, а про пероксидазу хрена как-то "забыли".

Таким образом, в настоящей диссертационной работе впервые получена анионная пероксидаза табака в больших (в перспективе промышленных) количествах, разработана методика рефолдинга белка с рекордным процентом восстановления активности, созданы конъюгаты ТОР с иммуноглобулинами и продемонстрированы очевидные преимущества полученного "инструмента" по сравнению с традиционным, основанным на пероксидазе хрена. Далее показаны преимущества химических методов иммобилизации при использовании ТОР в биосенсорах для

определения концентрации перекиси водорода, что, повторяю, стоит в работе несколько особняком.

К содержанию работы практически нет претензий - все эксперименты (очень большой объем) выполнены корректно, результаты и выводы не вызывают сомнений. Однако к оформлению работы есть некоторые вопросы.

Литературный обзор хорошо написан, содержит много интересной информации и соответствует тематике диссертации, но заголовки параграфов в нем вызывают некоторое недоумение. Так, параграф 2.1. озаглавлен "Структура и свойства пероксидазы табака". Между тем содержание этой главы не только не исчерпывается ТОР, но даже и не составляет там большей части. Речь идет о более общих вещах - механизме катализа пероксидазами, инактивации, и других свойствах всего набора гем-содержащих пероксидаз.

Аналогично п.2.3. озаглавлен "Экспрессия и рефолдинг рекомбинантной пероксидазы табака", а речь во всей главе идет о методах ренатурации рекомбинантных белков, которые экспрессируются в тельцах включения, в самом общем виде. И именно такое содержание главы совершенно адекватно - если бы целую главу в литобзоре можно было бы посвятить рефолдингу ТОР - непонятно, что тогда нового делалось в диссертации? То есть, при "правильном" содержании литобзора заголовки глав не отражают этого содержания.

Еще один вопрос возникает по поводу статьи 3 в списке публикаций. Не говоря уже о том, почему статья в русском журнале Биохимия оказалась в списке публикаций на английском языке - непонятно, как тематика этой статьи (химическая модификация пероксидазы хрена) относится к собственно результатам данной работы. Возможно (хотя трудно судить только по заголовку), эта публикация не совсем по теме диссертации. Насколько целесообразно ее включать в список, тем более что имеются две статьи в хороших журналах с высоким импактом, это вопрос неоднозначный.

Подводя итоги, следует заключить, что выводы работы в целом соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Диссертационная работа ЗАХАРОВОЙ Г.С. "Анионная пероксидаза табака: получение рекомбинантного фермента и его применение как компонента биоаналитических систем" является оригинальным исследованием и

полностью соответствует требованиям п.9 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.04 – биохимия.

Ведущий научный сотрудник,

Доктор химических наук

Туницкая В.Л.

Лаборатория молекулярных основ действия

физиологически активных соединений

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта

Российской академии наук

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32

т (499)1350590, e-mail: Ve_tun@mail.ru



СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по диссертации Захаровой Галины Сергеевны "Анионная пероксидаза табака: получение рекомбинантного фермента и его применение как компонента биоаналитических систем", представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.01.04 – биохимия.

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Основные научные труды
Туницкая Вера Леонидовна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта Российской академии наук вед. научн. сотр. Лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений	доктор химических наук	03.01.03 молекулярная биология	<ol style="list-style-type: none"> 1. Туницкая В.Л., Муковня А.В., Комиссаров В.В., Крицын А.М., Митькевич В.А., Кочетков С.Н. Взаимодействие белка вируса гепатита С NS3 с полиметиленовыми производными нуклеиновых оснований. Молекулярная биология 2010, 44(6): 1045-1053 2. Иванов М.А., Людва Г.С., Муковня А.В., Кочетков С.Н., Туницкая В.Л., Александрова Л.А. Синтез и биологические свойства пиримидиновых 4'-фторнуклеозидов и 5'-трифосфата 4'-фторуридина. Биоорганическая химия 2010 36(4): 526-534 3. Mukovnya A.V., Ivanov A.A., Gromyko A.V., Ivanov A.V., Streltsov S.A., Zhuze A.L., Kochetkov S.N. Inhibition of the helicase activity of the HCV NS3 protein by symmetrical dimeric bis-benzimidazoles. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2011, 21 (18): 5331-5335.

				<p>4. Туницкая В.Л., Хомутов А.Р., Кочетков С.Н., Котовская С.К., Чарушин В.Н. Ингибирование ДНК-гиразы лево-флорксацином и другими производными фторгетероциклов. <i>Acta Naturae</i> 2011, 4 (11): 109-114.</p> <p>5. Масалова О. В., Леснова Е. И., Шингарова Л. Н., Туницкая В. Л., Уланова Т. И., Бурков А. Н., Куш А. А. Комбинированное применение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей белка NS3 вируса гепатита С, гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и блокатора регуляторных Т-клеток индуцирует эффективный иммунный ответ против вируса гепатита С. <i>Молекулярная биология</i>, 2012, 46 (3): 525–534.</p> <p>6. Smirnova O.A., Isagulians M.G., Hyvonen M.T., Keinanen T.A., Tunitskaya V.L., Vepsalainen J., Alhonen L., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. Chemically induced oxidative stress increases polyamine levels by activating the transcription of ornithine decarboxylase and spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase in human hepatoma HUH7 cells. <i>Biochimie</i> 2012, 94(9): 1876-83.</p> <p>7. Коровина А.Н., Туницкая В.Л., Хомутов М.А., Симонян А.Р., Хомутов А.Р., Иванов А.В., Кочетков С.Н. Биогенные полиамины спермин и спермидин активируют РНК-полимеразу и ингибируют хеликазу вируса гепатита С. <i>Биохимия</i>, 2012, 77(10): 1414-1423.</p>
--	--	--	--	---

				<p>8. Масалова О.В., Леснова Е.И., Иванов А.В., Пичугин А.В., Пермякова К.Ю., Смирнова О.А., Туницкая В.Л., Уланова Т.И., Бурков А.Н., Кочетков С.Н., Атауллаханов Р.И., Куш А.А. Сравнительный анализ иммунного ответа на ДНК-конструкции, кодирующие неструктурные белки вируса гепатита С. Вопросы вирусологии, 2013, 58 (2): 21-28.</p> <p>9. Масалова О.В., Леснова Е.И., Пермякова К.Ю., Иванов А.В., Туницкая В.Л., Куш А.А. Усиление иммунного ответа при сочетанном введении рекомбинантных ДНК и белков репликативного комплекса вируса гепатита С. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2015, 33(1): 36-41</p>
--	--	--	--	--

Тунцкая В.Л.

д.х.н. ведущий научный сотрудник,
 Лаборатории молекулярных основ действия
 физиологически активных соединений
 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
 Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта
 Российской академии наук
 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32
 т (499)1350590, e-mail: Ve_tun@mail.ru

