

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 специальности 03.01.06 – биотехнология (в
том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия

Диссертационная работа Захаровой Галины Сергеевны посвящена исследованию особенностей рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака с целью получения активного фермента в большом количестве и выявлению преимуществ полученного фермента для использования в иммуноферментном анализе.

ДНК технологии существенным образом упростили задачу получения белковых молекул в большом количестве. В большинстве случаев гетерологичная экспрессия генов, кодирующих синтез ферментов, в клетках *Escherichia coli* – хорошо разработанной экспрессионной системе – позволяет свести задачу получения простых по структуре ферментов к набору стандартных процедур. Однако в том случае, когда источником фермента являются таксономически отдаленные организмы или структура фермента является сложной, задача получения активного фермента значительно осложняется. Анионная пероксидаза табака как раз является таким примером: это гем-содержащий гликозилированный фермент, структура которого поддерживается четырьмя дисульфидными связями и двумя кальций-связывающими центрами. Экспрессия этого белка в *E.coli* приводит к образованию неактивного фермента в виде телец включения. Белка много, а активного фермента нет. Это распространенная ситуация для биотехнологии. В настоящей работе на примере одного из востребованных в биотехнологии ферментов – пероксидазы - анализируются и исследуются пути решения проблемы получения фермента сложной структуры в большом количестве с помощью управляемого процесса правильной ренатурации (рефолдинга) белковых молекул, а также разрабатываются способы применения полученного фермента в биоаналитических системах.

Актуальность темы диссертации

Актуальность темы диссертационной работы, прежде всего, обусловлена необходимостью дальнейшего развития иммуноферментных систем за счет использования

уникальных ферментов с высокой активностью и стабильностью. В настоящее время именно иммунохимические методы, основанные на использовании антител, меченных пероксидазами, являются наиболее востребованными детектирующими системами. Поэтому поиск новых ферментных меток позволяет улучшить характеристики иммуноанализа.

В свою очередь исследование особенностей рефолдинга рекомбинантных белков является также востребованным направлением в практическом отношении в связи с необходимостью получения большого количества активных молекул ферментов для развития биокаталитических систем различного назначения.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

На основании проведенной исследовательской работы автором сделано 5 выводов. Все выводы диссертационной работы Захаровой Г.С. основаны на большом экспериментальном материале, соответствуют поставленным в диссертации задачам и полностью отражают результаты работы. Для достижения цели и решения задач диссертант использовала широкий круг биохимических и молекулярно-генетических методов (анализ ферментативной активности, очистка фермента с помощью гель-фильтрации, оптимизация рефолдинга белковых молекул), а также методов иммунохимии – конъюгация с антителами, иммобилизация фермента на электроде, вольтамперометрические измерения, что обеспечило получение надежных результатов.

Используемые в данной работе методы гетерологичной экспрессии и получения активных рекомбинантных белков за счет рефолдинга, а также методы иммуноанализа являются современными, в полной мере, соответствующими мировому уровню исследований. Они характеризуются высокой надежностью и воспроизводимостью, что позволяет соотносить результаты, полученные в диссертационной работе Захаровой Г.С., с результатами других научных групп. В этой связи достоверность каждого результата и вывода диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной как в области рефолдинга, так в области иммуноанализа. Систематическое исследование процесса рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака обеспечило достижение наивысшего уровня эффективности рефолдинга для пероксидаз – около 85%. Впервые выявлено изменение субстратной специфичности фермента под влиянием ионов кальция: активность рекомбинантного фермента в отношении разных ароматических субстратов изменяется не пропорционально.

Показано, что применение рекомбинантного фермента в иммуноанализе позволяет повысить интенсивность сигнала по сравнению с коммерческими наборами в 2-3 раза. Еще более высокий уровень сигнала (в 20-100 раз) наблюдался при детекции хемилюминисценции. Впервые проведена химическая иммобилизация гТОР на графитовом электроде и показано существенное улучшение чувствительности биосенсора (около 5 раз).

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

Диссертационная работа Захаровой Г.С. носит ярко выраженный прикладной характер. В этой связи полученные в ходе выполнения работы результаты по оптимизации рефолдинга пероксидазы и применению полученного фермента для иммуноанализа имеют большое значение для повышения эффективности иммуноферментных систем. Выявленные преимущества использования гТОР в качестве ферментной метки для иммуноанализа позволяют повысить эффективность метода от 2 до 100 раз в зависимости от способов детекции.

Научная ценность работы связана с получением большого массива данных по влиянию различных факторов на процесс рефолдинга, управление которыми позволяет направленно получать фермент с измененными каталитическими свойствами, например с помощью ионов кальция изменять субстратную специфичность или стабильность. Кроме того полученные результаты по химической иммобилизации фермента на поверхности электрода открывают новые возможности к созданию безреагентных биосенсоров.

3. Содержание диссертации.

Диссертационная работа Захаровой Г.С. построена по традиционному плану, изложена на 159 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, выводов и списка литературы, включающего 260 источника. В целом диссертация носит законченный характер, отлично иллюстрирована, содержит 70 рисунков и 9 таблиц.

Цели, задачи, актуальность, научно-практическая значимость проводимого исследования описаны во введении к диссертационной работе. В обзоре литературы Захаровой Г.С. детально рассматривает всю информацию, касающуюся пероксидаз, включая описание особенностей структуры, механизма действия, каталитических свойств и их применении в иммуноанализе. Большой раздел обзора посвящен анализу методов рефолдинга рекомбинантных белков. Представленный в работе обзор литературы

свидетельствует, что диссертант хорошо знаком с литературой, прекрасно ориентируется в предмете изучения и способен к критическому анализу и выявлению проблем и нерешенных вопросов, что позволяет на основе анализа литературы сформулировать цели и новые задачи по изучению пероксидазы табака.

Раздел диссертации, посвященный описанию материалов и методов, содержит детальное описание всех использованных методов, что позволяет использовать разработанные подходы другими исследовательскими коллективами. Все задачи, предусмотренные диссертационной работой (оптимизация условий проведения рефолдинга рекомбинантной пероксидазы, получение конъюгатов для иммуноферментного анализа и исследование способов иммобилизации гТОР на электроде для создания безреагентных биосенсоров) выполнены в полном объеме. Для обеспечения достоверности и обоснованности полученных результатов в работе были использованы оптимальные методы исследования.

Экспериментальная часть работы разделяется на две большие части: получение активной гТОР в большом количестве и разработка способов применения гТОР для иммуноанализа и создания сенсоров.

В рамках выполнения первой задачи – гетерологичная экспрессия пероксидазы табака в клетках *E.coli* и оптимизация процесса реактивации рекомбинантной пероксидазы, содержащейся в клетках *E.coli* в виде телец включения - следует отметить способность диссертанта добиваться положительного результата в зоне высокого риска. Это достигается благодаря отличному знанию объекта исследования, учету особенностей процесса и огромному объему экспериментов. Незначительные модификации среды (концентрация фосфатов и добавки глицерина) и условий индукции позволили диссертанту повысить выход гТОР в 4 раза. В свою очередь оптимизация условий рефолдинга гТОР, включая все этапы, компоненты среды для рефолдинга позволили существенно повысить выход активного фермента до 84%. И хотя основное техническое решение, позволившее повысить эффективность рефолдинга, - резкое снижение концентрации белка в рефолдинг-среде – не отличается особым изяществом, однако для фермента, который используется в иммуноанализе, это решение полностью оправдано. Единственное замечание по первой части работы касается представления результатов работы по оптимизации. Диапазоны параметров выбраны таким образом, что крайний показатель соответствует максимальным значениям. Например, рис. 4.4, 4.7, 4.10. Возникает вопрос: а что происходит за пределами этих диапазонов?

В рамках выполнения второй задачи - разработка способов применения гТОР для иммуноанализа и создания сенсоров – продемонстрированы существенные преимущества

гТОР в качестве ферментной метки для иммуноанализа. Сравнительный анализ конъюгатов пероксидазы хрена и гТОР и его мутанта с антителами в иммуноферментном анализе продемонстрировал в случае колориметрической детекции повышение уровня сигнала в 2-3 раза для гТОР и гТОР-F140Y. В случае хемилюминесцентной детекции интенсивность сигнала для гТОР-IgG была в 110 раз выше. Кроме того при использовании пероксидазы табака повысилась чувствительность определения почти в 50 раз. Важные результаты были получены при использовании гТОР для создания безреагентного сенсора. Это, прежде всего, разработка модифицированной методики химической иммобилизации гТОР на графитовом электроде, которая позволила снизить предел обнаружения H_2O_2 на 30%, при этом повысить чувствительность и линейный диапазон. Разработанная методика позволяет не только ковалентно связать фермент с электродом, но и обеспечивает образование межмолекулярных ковалентных сшивок, что и является, по мнению диссертанта, причиной высокой операционной стабильности биосенсора. Это очень интересное предположение, учитывая широкое использование CLEA – технологии для стабилизации ферментов. В данном случае требуются более строгие доказательства роли меж- и внутримолекулярных сшивок в стабилизации фермента, в том числе демонстрация агрегации белка под действием сшивающих агентов.

В целом замечания к экспериментальной части работы не носят принципиального характера и свидетельствуют о высокой культуре выполнения экспериментальной работы.

4. Опубликование результатов диссертации в научной печати.

Результаты и выводы диссертационной работы Захаровой Г.С. в полном объеме представлены в печатных работах – 3-х статьях, опубликованных в российских и зарубежных научных журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях, что нашло отражение в 9 тезисах докладов.

5. Содержание автореферата.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

6. Заключение.

Диссертационная работа Захаровой Г.С. «Анионная пероксидаза табака: получение рекомбинантного фермента и его применение как компонента биоаналитических систем» представляет собой законченное исследование, результаты которого имеют важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов биотехнологии и биохимии. Она отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения

ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор Захарова Галина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия.

Заместитель директора по научной работе

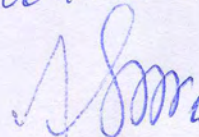
Государственного научного центра РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
(117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1)

www.genetika.ru, тел. 8(495)3151247,

e-mail оппонента: yanenko@genetika.ru

доктор биологических наук, профессор

06.10.2015



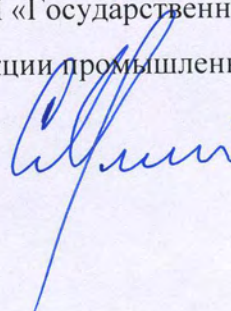
Яненко А.С.

Подпись д.б.н., профессора Яненко А.С. заверяю

Ученый секретарь

Государственного научного центра РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»,

Кандидат химических наук



Яроцкий С.В.

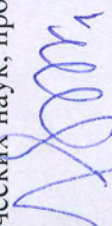
СВЕДЕНИЯ

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 специальностям 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия.

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности в совете	Основные научные труды
Яненко Александр Степанович	Российская Федерация	Государственный научный центр РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», заместитель директора по научной работе	доктор биологических наук, профессор	03.02.07 - генетика, 03.02.03 - микробиология (биологические науки)	<p>1. Alexander Yanenko, Steffen Osswald. Hydrolysis of Nitriles to Amides. In: "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis", Ed.: Karlheinz Drauz, Harald Gröger, Oliver May. Third Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2012, pp. 531–544.</p> <p>2. Steffen Osswald, Alexander Yanenko. <u>Hydrolysis of Nitriles to Carboxylic Acids</u>. In: "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis", Ed.: Karlheinz Drauz, Harald Gröger, Oliver May. Third Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2012, pp. 545–559. Published Online: 20 APR 2012, DOI: 10.1002/9783527639861.ch14.</p> <p>3. Лавров К. В., Яненко А. С. Клонирование гена новой ациламидазы из <i>Rhodococcus erythropolis</i> и его экспрессия в <i>Escherichia coli</i> // Генетика. 2013. Т. 49. № 10. С. 1236-1240.</p> <p>4. Лавров К. В., Новиков А. Д., Рябенко Л. Е., Яненко А.С. Экспрессия гена ациламидазы в штаммах <i>Rhodococcus erythropolis</i> // Генетика. 2014. том 50. № 9. С. 1133–1137.</p>

					<p>5. Новиков А.Д., Дербиков Д.Д., Шапошникова О.В., Губанова Т.А., Каменева С.В., Яненко А.С. Высокоэффективная экспрессия гена аспартазы (L-аспартат-аммонийлиазы) в клетках <i>Escherichia coli</i> // Биотехнология. – 2014. - № 5. – С. 19-24.</p> <p>6. Лавров К. В., Карпова И. Ю., Елремян А. С., Яненко А. С. Клонирование и анализ гена новой алифатической амидазы из <i>Rhodococcus erythropolis</i> TA37 // Генетика, 2014, том 50, № 10, с. 1–9.</p>
--	--	--	--	--	--

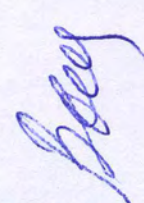
Заместитель директора по научной работе
доктор биологических наук, профессор



Яненко Александр Степанович
Государственный научный центр РФ
ФГУП «Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1
www.genetika.ru, тел. 8(495)3151247,
e-mail: yankov@genetika.ru

Подпись д.б.н., профессора Яненко А.С. заверяю
Ученый секретарь

Государственного научного центра РФ
ФГУП «Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»,
кандидат биологических наук

Войушина Татьяна Львовна