



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

09.10.15
138-214.1-435

У Т В Е Р Ж Д А Ю
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН,
академик РАН, профессор
В.Т. Иванов



“ 9 ” октября 2015 г.

О Т З Ы В
В Е Д У Щ Е Й О Р Г А Н И З А Ц И И

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)
и 03.01.04 – биохимия.

Структурно-функциональные исследования ферментов играют исключительно важную роль как при изучении особенностей функционирования ферментов *in vivo*, так и при создании новых биокатализаторов методами белковой инженерии. Проведение подобных исследований позволяет не только детально изучать механизмы действия ферментов, но и разрабатывать подходы по направленному изменению свойств природных ферментов для решения конкретных биотехнологических задач.

Фермент, который является объектом исследования в диссертационной работе Захаровой Г.С. – пероксидаза табака – относится к группе ферментов, которые активно изучаются в течение последних лет. Самым известным ферментом этой группы является пероксидаза из корней хрена. Это наиболее изученный среди растительных пероксидаз фермент как с точки зрения механизма действия, так и структуры. Кроме того, этот фермент наиболее широко используется в иммуноферментном анализе. Более 70% всех коммерческих диагностических наборов на основе иммуноферментного анализа в качестве метки содержат именно пероксидазу хрена. Ряд наборов, в которых используется в качестве системы детекции регистрация хемилюминесценции при окислении люминола, имеют очень высокую чувствительность. Кроме того, на основе пероксидазы из корней хрена разработаны биосенсоры для определения пероксида водорода и выявления загрязнения окружающей среды фенолами. Также была показана возможность применения пероксидазы из корней хрена в тонком органическом синтезе (например, для получения полианилина). Однако пероксидаза из корней хрена имеет ряд существенных недостатков, которые ограничивают ее применение на практике. Это и недостаточно широкий рН-оптимум активности, и инактивация в ходе реакции, и необходимость применения специальных соединений-усилителей хемилюминесценции при окислении люминола, и низкая стабильность в присутствии пероксида водорода. Были проведены эксперименты по белковой инженерии пероксидазы из корней хрена, однако достигнутые результаты не удовлетворяли необходимым требованиям.

В силу вышеуказанных причин во всем мире ведутся активные работы по выделению и изучению пероксидаз из других растений, которые обладали бы более высокими характеристиками. Одним из таких ферментов оказалась пероксидаза табака, которая активно изучалась на кафедре химической энзимологии и в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, в которой и работает соискатель. Было показано, что этот фермент намного превосходит пероксидазу из корней хрена по многим параметрам, включая рН-оптимум активности и величину интенсивности хемилюминесценции и отсутствию необходимости использовать усилители. Кроме того, пероксидаза табака была более эффективной в процессах прямого переноса электронов на поверхности биосенсора. Однако в природном источнике (*Nicotiana tabacum*) содержание фермента было очень низким (менее 5 мг на кг листьев). Поэтому были получены трансгенные растения табака и томата, в которых содержание фермента было повышено в 10 раз, но методика очистки требовала дорогостоящих реагентов. Следующим шагом стало получение рекомбинантного негликозилированного фермента с использованием клеток *E.coli*. Так как в этом

случае пероксидазы табака экспрессировалась в виде нерастворимых телец включения, для получения активного фермента необходимо было проводить специальную процедуру реактивации (которую еще называют рефолдингом). Несмотря на достигнутый высокий уровень экспрессии, разработанная методика рефолдинга не позволяла получить большое количество фермента (выход активного фермента составлял всего несколько процентов от общего количества пероксидазы, синтезируемой в виде телец включения). Из-за низкого выхода активного фермента было невозможно изучить его свойства в качестве метки для иммуноферментного анализа. Также следствием малого количества доступного фермента стало ограниченное количество информации по связыванию и поведению рекомбинантной пероксидазы табака на поверхности электродов, на основе которых были получены биосенсоры.

В свете вышесказанного, диссертационная работа Захаровой Г.С., посвященная оптимизации методики реактивации рекомбинантной пероксидазы табака и изучению ее поведения при использовании в иммуноферментном анализе и при связывании на поверхности электрода, является актуальной и практически значимой. В своей работе диссертант решал следующие задачи: оптимизация условий проведения рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака для повышения выхода активного фермента; получение конъюгатов рекомбинантной пероксидазы табака с вторичными антителами; сравнение свойств рекомбинантной пероксидазы табака в качестве ферментной метки с использующейся на практике пероксидазой хрена при проведении иммуноферментного анализа с колориметрической и хемилюминесцентной детекцией и изучение влияния способа иммобилизации на электрохимические свойства рекомбинантной пероксидазы табака при создании биосенсоров с прямым переносом электронов.

Диссертационная работа Захаровой Г.С. построена по традиционной схеме. Она состоит из следующих разделов: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и их обсуждения, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 159 страницах, включает 70 рисунков, 9 таблиц и 260 литературных ссылок.

Обзор литературы состоит из нескольких частей. Первая часть посвящена анализу полученных ранее данных по структуре и свойствам пероксидазы табака и влиянию ионов кальция на свойства пероксидаз. Следующая часть посвящена анализу экспрессии и рефолдингу пероксидаз. В третьей части анализируется применение пероксидаз в иммуноферментном анализе и в составе биосенсоров. Хочется подчеркнуть, что для наглядности и простоты восприятия материала представленные данные иллюстрированы большим количеством рисунков. В целом Обзор литературы хорошо построен и дает подробное представление о текущем

состоянии проблемы. Из Обзора литературы логично вытекают поставленные цели и задачи диссертационной работы Захаровой Г.С.

В разделе Материалы и Методы описаны материалы, которые были использованы автором в его исследовании, и приведено подробное описание современных методов, использованных в работе. Этот раздел свидетельствует о том, что данная диссертационная работа охватывает различные области современной науки и говорит о большом объеме проведенных исследований и высокой квалификации автора в области современной молекулярной биологии и биохимии, а также химической энзимологии, физической химии и микробиологии.

Раздел Результаты и их обсуждение состоит из пяти глав. В каждой главе дается подробное объяснение по выбору используемых подходов и важности решаемых задач. Результаты всех экспериментов проиллюстрированы на соответствующих рисунках, графиках, диаграммах и систематизированы в соответствующих таблицах.

В первой главе Обсуждения результатов описана оптимизация условий экспрессии рекомбинантного фермента в клетках *E.coli*. Был выбран наилучший рекомбинантный штамм *E.coli* - продуцент пероксидазы табака, было изучено влияние добавок к питательной среде, температуры культивирования, момента индукции, времени культивирования и других параметров, изменение которых позволило поднять общий выход фермента с литра среды с 50 до 200 мг.

Во второй главе была проведена очень большая работа по оптимизации условий реактивации фермента. Были оптимизированы такие параметры, как концентрация белка в среде для рефолдинга, рН среды, концентрация мочевины, концентрация и соотношение восстановленного и окисленного SH-реагентов, концентрация ионов кальция. Отдельно следует отметить эксперименты по изучению момента добавки и концентрации гемина, времени последующей инкубации, а также по влиянию концентрации ионов кальция на эффективность рефолдинга рекомбинантной пероксидазы табака, каталитическую активность и термостабильность фермента. Кроме метода реактивации, известного как "метод разведения", авторы для рефолдинга фермента из телец включения применили второй подход, предусматривающий проведение реактивации на колонке в ходе гель-фильтрации. Однако оказалось, что второй подход менее эффективен по сравнению с первым. В целом, на втором этапе были найдены оптимальные параметры, которые позволили повысить выход активного фермента. По сравнению с одной из ранее предложенных методик выход фермента вырос в 6 раз. Кроме того новая методика обеспечивала в 4 раза более высокую удельную активность. В сравнении с другой ранее предложенной методикой очищенные препараты имели близкую удельную активность, однако выход увеличился более, чем в 26 раз. Стоит отметить, что эффективность реактивации составила 85%, что

является одной из самых высоких величин для реактивации растительных пероксидаз. Кроме того, была показана высокая стабильность рекомбинантного фермента после рефолдинга, что позволило проводить дальнейшую его очистку без угрозы потери каталитической активности. Авторы также показали, что найденные оптимальные условия обеспечивают высокий выход фермента и в случае мутантной пероксидазы табака с заменой Phe140Tyr. По оптимизированной методике были наработаны препаративные количества рекомбинантной пероксидазы табака и ее мутантной формы, которые были успешно использованы в дальнейших экспериментах.

Следующим этапом исследований было изучение поведения рекомбинантной пероксидазы табака в качестве метки в хемилюминесцентном анализе. Был проведен анализ трехмерной структуры, на основании которого был предложен метод иммобилизации за счет модификации аминокрупп фермента и были получены конъюгаты фермента с антителами по предложенной методике, которая не влияла на активность фермента. Сравнение результатов иммуноанализа, для проведения которого за основу был взят коммерческий набор, полученных с использованием конъюгатов антител с пероксидазой из корней хрена и рекомбинантной пероксидазой табака показало преимущество последней при колориметрической, и, в особенности, при люминометрической детекции.

В финальном разделе Обсуждения результатов были проведены оптимизация иммобилизации рекомбинантной пероксидазы табака на поверхности электрода и сравнительное исследование биосенсоров, полученных с помощью двух классических (физическая адсорбция и химическая фиксация) и новой методик иммобилизации. Были показаны более высокие вольтамперометрические характеристики нового безреагентного биосенсора, получены количественные характеристики функционирования пероксидазы на электроде при различных условиях иммобилизации.

В целом следует отметить, что полученные автором результаты представляют как фундаментальный интерес, с точки зрения взаимосвязи структуры и функции фермента, так и имеют важное практическое значение.

Необходимо отметить аккуратное и наглядное оформление всех рисунков, графиков, диаграмм и таблиц, что значительно упрощает восприятие большого количества экспериментального материала. Работа написана грамотным научным языком и выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях с использованием самых современных и разносторонних методов исследования из различных областей науки (биохимия, биотехнология, молекулярная биология, микробиология, химическая энзимология, физическая химия, биоинформатика и др.). Результаты диссертации конкретны и обладают большой научной новизной и практической значимостью. Выводы диссертации хорошо обоснованы и

непосредственно следуют из представленных экспериментальных данных. Данная работа вносит существенный вклад в исследование взаимосвязи структуры и функций пероксидаз растений, а также открывает новые перспективы практического применения рекомбинантной пероксидазы табака.

При ознакомлении с работой возникли следующие замечания и пожелания:

- во всей работе автор использует термины, которые являются прямым заимствованием из английского языка. Например "рефолдинг" используется намного чаще, чем "реактивация";

- в главе 4.2, часть 4.2.2. автор выбрал в качестве оптимального значение рН 9,5, хотя на рис. 4.7. четко наблюдается рост активности при повышении рН. Было бы интересно узнать, почему не были проведены эксперименты при более высоких значениях рН;

- в главе 4.6. автор проводит большое количество рисунков, на сама глава написана довольно лаконично. Можно было бы было провести более подробное обсуждение механизма наблюдаемых эффектов.

Данные замечания касаются формы представления результатов и никак не связаны с научной новизной и достоверностью полученных данных. Выше приведенные замечания никоим образом не снижают общую положительную оценку работы, которая выполнена на высоком профессиональном уровне. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных. Особо следует подчеркнуть объем экспериментальной работы, который превышает таковой для стандартных кандидатских диссертаций. Основные результаты отражены в 3 статьях, опубликованных в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ (2 международных) и 9 тезисах докладов на международных конференциях и симпозиумах. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Полученные автором результаты могут быть использованы в лабораториях, работающих в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии - в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Федеральном исследовательском центре "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, на Химическом и Биологическом факультетах и Факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова.

Диссертационная работа Захаровой Г.С. полностью удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым в пунктах 9-14 «Постановления о порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор, безусловно, заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата

химических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.01.04 – биохимия.

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН 5 октября 2015 г.

Заведующий лабораторией биокатализа
Института биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
член-корреспондент РАН,
доктор химических наук, профессор

А.Г. Габибов

Подпись А.Г. Габибова заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН, д.ф.-м.н.

В.А. Олейников

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН)

Отдел пептидно-белковых технологий, лаборатория биокатализа,

тел. +7 (495) 727-38-60,

gabibov@mx.ibch.ru



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

№ _____

на № _____ от _____

**Сведения о ведущей организации по диссертации 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)

и 03.01.04 – биохимия.

Полное и сокращенное наименование:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук (ИБХ РАН)

Место нахождения, почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты, адрес
официального сайта в сети «Интернет»:

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; 8 (495) 335-01-00;

E-mail: office@ibch.ru www.ibch.ru

Директор: академик Иванов Вадим Тихонович

Список публикаций сотрудников ИБХ РАН по теме диссертации:

1. Kim Y.V., Gasparian M.E., Bocharov E.V., et al. New strategy for high-level expression and purification of biologically active monomeric TGF- β 1/C77S in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol.* 2015;57(2):160-171.
2. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering. *Russ Chem Rev.* 2015;84(1):1.
3. Smirnov I.V., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., Genkin D.D., Deyev S.M., Gabibov A.G. Chemical polysialylation of recombinant human proteins. *Methods Mol Biol.* 2015;1321:389-404.
4. Kharlampieva D., Manuvera V., Podgorny O., et al. Recombinant fragilysin isoforms cause E-cadherin cleavage of intact cells and do not cleave isolated E-cadherin. *Microb Pathog.* 2015;83-84:47-56.
5. Kasheverov I.E., Kudryavtsev D.S., Ivanov I.A., et al. Rational design of new ligands for nicotinic receptors on the basis of α -conotoxin PnIA. *Dokl Biochem Biophys.* 2015;461(1):106-109.

