

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Каменева Дмитрия Геннадьевича

"Исследование рекомбинантного силикатеина *LoSilA1* и катепсина *LoCath* морской губки *Latrunculia oparinae*",

представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Представленная работа посвящена исследованию полимеризующих свойств двух новых рекомбинантных силикатеиноподобных белков из морской губки *Latrunculia oparinae* для определения возможности их использования в получении редких по своей форме кремниевых наноструктур. В последнее время структурные соединения кремния различной степени сложности и упорядоченности находят широкое применение в развивающихся отраслях современной промышленности, таких как оптике, электронике и вычислительной технике. Однако большинство способов получения кремниевых наноструктур связано с использованием экстремальных температур, или сложных условий синтеза. Изучение процессов формирования спикул у губок привело ученых к пониманию молекулярных основ биосилификации. Спикулы представляют собой новый вид биоминеральных фотонных кристаллов, хорошо пропускающих свет в видимом и ближнем ИК-диапазонах и обладающих повышенной гибкостью в сравнении с промышленными кварцевыми волоконными световодами. Было установлено, что процесс биосилификации у губок контролируют силикатеины - белки-гомологи цистеиновых протеаз семейства L, катепсинов, относящихся к суперсемейству папаиновых протеаз. Также известно, что силикатеины способны конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана (ТЕОС), с образованием кремниевых наноструктур определенной формы в условиях окружающей среды. Данное свойство силикатеинов легло в основу исследования способности образовывать кремниевые наноструктуры белками губки *Latrunculia oparinae* сем. *Demospongia*, установленными по структурной гомологии как силикатеин *LoSilA1* и силикатеиноподобный катепсин *LoCath*. Однако получение данных белков из

глубоководного природного источника сопряжено с трудностями добычи губок и очистки продукта. Таким образом, актуальность темы диссертационного исследования Д.Г. Каменева определяется необходимостью разработки новых способов получения кремниевых наноструктур на основе рекомбинантных силикатеиноподобных белков и создания для этих целей рекомбинантных или трансгенных суперпродуцентов этих белков на основе бактерий или растений с устойчивой системой экспрессии.

Научная новизна работы заключается в том, что автором впервые получены генетические конструкции, несущие гены силикатеина *LoSilA1* и флуоресцентного белка GFP для установления внутриклеточной локализации силикатеина в каллусных культурах и трансгенных модельных растениях, что может быть использовано в оптимизации методов выделения силикатеинов и получения эффективных культур-продуцентов. Впервые получены данные о формировании отдельных кристаллов оксида кремния с помощью рекомбинантного силикатеина *LoSilA1* и силикатеиноподобного катепсина *LoCath*. Впервые на экстрактах трансгенных культур табака *N. tabacum*, экспрессирующих силикатеин *LoSilA1*, показана возможность создания новых эффективных биотехнологических систем получения наночастиц серебра.

Диссертация имеет стандартное построение: включает обзор литературных данных, методическую и экспериментальную части, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 101 странице и иллюстрированы 6 таблицами и 22 рисунками. Список литературы содержит 125 наименований.

Во введении автор обосновывает необходимость предпринятого исследования, выбор объектов исследования и модельных генетически модифицируемых систем для разработки биотехнологического способа получения продуктов исследования. Однако в объявляемой цели работы стоит исследование каталитических свойств рекомбинантных силикатеиноподобных белков, что должно подразумевать не только констатацию факта протекания каталитического процесса формирования наноструктур кремния в присутствии этих белков, но и определение кинетических параметров реакции, таких как константа Михаэлиса, число оборотов фермента, эффективность биокатализатора, которые в диссертации не были представлены.

Отсюда вытекает, что не все поставленные задачи соответствующим образом отражены в выводах. Также в п.3 автор заявляет получить рекомбинантный штамм *E.coli* для синтеза силикатеина и катепсина, но в выводах об этом не упоминает, акцентируя внимание лишь на получение трансгенной культуры табака *N. tabacum* для экспрессии силикатеина *LoSilA1*. Это не умаляет значимости проделанной работы диссертантом, но указывает на необходимость в будущем более корректно формулировать цели и задачи.

Обзор данных литературы написан хорошим научным языком и включает новейшую литературу по теме диссертационной работы. Хорошо изложены данные по молекулярным особенностям, физико-химическим свойствам и физиологической роли силикатеиноподобных пептидов и других, сопутствующих процессам биоминерализации и биосилификации, белков из различных биологических объектов, включая диатомовые водоросли, покрытосеменные растения, магнитосомные бактерии, хитин- и кремнийсодержащие беспозвоночные. Особое внимание уделено исследованиям структур, свойствам и функциям гибких стекловидных образований губок – спикул, содержащих силикатеины, катепсины и другие вспомогательные белки. Проведен глубокий анализ первичной и третичной структур силикатеинов и катепсинов, а также филогенетический анализ, из которых были выявлены наиболее консервативные и функционально-значимые участки их каталитических доменов, указывающие на общность происхождения. Однако не совсем понятно, почему силикатеиноподобный белок губки *LoCath*, обладающий доказанной автором кремний-полимеризующей активностью, был отнесен к катепсинам. Наличие силикатеиновой активности и большей структурной гомологии с силикатеинами, чем с катепсинами, за исключением одного аминокислотного остатка в активном центре (цистеина), склоняет к мысли, что *LoCath* может быть силикатеином. Вероятно, данная мутация не сильно отразилась на функцию природного силикатеина, либо она могла возникнуть на каком-нибудь этапе клонирования. Было бы не плохо в следующих работах повторить эксперимент по амплификации и клонированию кДНК этого белка, а также проверить у него наличие протеазной активности. Несмотря на это, содержание обзора литературы в целом свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в исследуемой проблеме,

включая методы получения гетерологических экспрессионных систем для биосинтеза рекомбинантных белков эукариот, визуализации трансгенных белков в клетке, получения чистых препаратов этих белков. Подробно освещена проблема получения нанокристаллов оксида кремния нужной формы и синтеза наночастиц различных металлов.

Методологический подход автора адекватен для выполнения поставленной задачи. Использован большой набор биохимических, цитологических и физико-химических методов и генно-инженерных подходов для исследования. Особенно актуальны освоенные автором методы получения генетических векторов и трансгенных растений. Однако, для читателя данной работы было бы полезным узнать номер плазмиды pPZP, взятой за основу для получения бинарного вектора, а также видеть карту плазмиды pPZP-RCS2, кассетного вектора pSAT6, либо ссылку на литературный источник, или производителя. Желательно обосновывать выбор плазмид, если это связано с выбором подходящего промотора и/или селективного маркера, способа трансформации с помощью агробактерий, указать, кем они предоставлены. В п. 2.15. не указан способ высвобождения белков из растительных клеток перед двухстадийной аффинной очисткой, если предполагалось получать целевые белки в культуральную среду, то надо было это отметить и указать объемы и концентрации белкового раствора перед нанесением на колонку. В п. 2.18. автор в качестве контроля способности трансгенного табака к фитосинтезу наночастиц серебра указывает лишь нетрансгенные каллусные культуры растения, а про контроль образца с плазмидой без рекомбинантного силикатеина пишет лишь в обсуждении результатов в п. 3.4. В эксперименте с получением наночастиц табака не хватает трансгенной каллусной культуры табака с «пустым вектором», т.е. без гена силикатеина. Как оценивалась статистическая значимость полученных данных? Несмотря на возникшие вопросы, все примененные в исследовании методы современны и соответствуют мировому уровню.

Результаты и их обсуждение изложены на 42 страницах. Этот раздел написан хорошо, имеет внутреннюю логическую связь и информативен. Проведена большая работа по количественному определению изоформ силикатеинов роговой губки *L. oparine* методом ПЦР в реальном времени, чтобы выявить наиболее активно экспрессирующуюся форму белка – силикатеин *LoSilA1*. Создано и апробировано

несколько вариантов конструкций, включая бифункциональную гибридную конструкцию с флюорофором GFP, для генетической модификации клеток-продуцентов рекомбинантных силикатеинов и катепсина. Исследованы продукты реакции полимеризации кремния *in vitro* в присутствии рекомбинантных силикатеиноподобных белков с помощью микроскопии, в результате чего было выявлено, что форма и размер кристаллов зависят от концентрации предшественников и времени инкубации. Автор полагает, что формирование более крупных и гетерогенных по форме кристаллов в присутствии силикатеиноподобного белка *LoCath* может указывать на преимущественно неферментативный механизм реакции, что доказывает его принадлежность к катепсинам. Однако степень отличия и механизм действия белков *LoCath* и *LoSilA1* следует подтвердить анализом их каталитических показателей в дальнейших исследованиях. Интересно будет также проанализировать контакты остатков активного центра силикатеина *LoSilA1* и катепсина *LoCath* с субстратом методом молекулярного докинга или суперпозиции с подходящим прототипом, чтобы определить степень влияния мозаичной структуры на субстрат-связывающую функцию. Тем не менее следует отметить, что в данной диссертационной работе автору впервые удалось получить с помощью силикатеинов отдельные кристаллы редкой тетрагексаэдральной формы, тогда как ранее были известны лишь случаи образования аморфных отложений кремния и друз кристаллов. Более того, автор заявил о создании трансгенных каллусных линий культуры табака для обеспечения рекомбинантного силикатеина роговой губки *L. oparinae* свойствами природного белка посттрансляционной модификацией. В подтверждении этого было бы неплохо сравнить свойства белков, полученных в результате биосинтеза в *E. coli* и растениях. Однако автор выявил и изучил неравномерное распределение GFP-меченного силикатеина в клетках и каллусах. Автор отмечает, что основная часть белка скапливается в мембранах, возможно в тельцах включения, этим объясняя невысокий уровень экспрессии растворимой формы силикатеина. Существуют ли способы повышения уровня экспрессии растворимой формы силикатеина в растениях, и насколько стабилен такой силикатеин, можно ли проверить наличие его посттрансляционной модификации в результате такой гетерологической экспрессии? Автор обещает, что влияние гена силикатеина на стабильность

трансформации, репродуктивную функцию растения и способность накапливать кремний до образования кремниевых структур будут изучены в скором времени.

Интересны и важны данные по влиянию рекомбинантного силикатеина на процессы фитосинтеза наночастиц серебра. Количество полученных гомогенных наночастиц, сформированных при смешивании экстрактов трансгенной культуры с нитратом серебра, в 3 раза превышает контроль, косвенно подтверждая функциональность и металлполимеризующие свойства рекомбинантного силикатеина в растительной клетке, что наряду с возможностью получения упорядоченных кристаллических структур оксида кремния может быть также использовано в биотехнологии.

Заключение и выводы соответствуют материалу диссертации. Основные данные, приведенные в диссертационной работе, отражены в опубликованных статьях. Автореферат достаточно полно представляет материалы диссертации.

В целом работа Каменева Дмитрия Геннадьевича выглядит достаточно интересной и информативной, за исключением некоторых вышеупомянутых замечаний и пожеланий. Замечания, связанные с оформлением работы, такие как опечатки, стилистические неточности, пунктуация, несоответствие пунктов разделов в автореферате и диссертации, не снижают ценности представленной работы.

В итоге можно сделать следующее заключение. Диссертация Каменева Дмитрия Геннадьевича по содержанию соответствует специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе нанобиотехнологии), и имеет несомненную научную и практическую ценность. Диссертационная работа Каменева Дмитрия Геннадьевича является завершённым исследованием в рамках поставленной научно-исследовательской цели и вносит существенный вклад в развитие биохимии морских беспозвоночных, биотехнологии применения их первичных метаболитов – силикатеиноподобных белков, ликвидирует пробелы в знаниях об их функции и полимеризующих свойствах. По актуальности темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности и новизне результатов, их значимости для науки и практики, диссертационная работа отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор работы заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе нанобиотехнологии).

Старший научный сотрудник лаборатории морской биохимии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения академии наук, кандидат биологических наук

Адрес: 690022, Владивосток, Проспект 100 лет Владивостоку, 159

тел. 8(423) 231-40-50, e-mail: lbalabanova@mail.ru



20 февраля 2016 г.

Лариса Анатольевна Балабанова

Личную подпись
УДОСТОВЕРЯЮ
Начальник ОК
ТИБОХ ДВО РАН
" № " февраля 20 16 г.

Лариса Анатольевна Балабанова



Биолого-почвенный институт
ДВО РАН
Входящий № 41
" 24 " 02 20 16 г.

Сведения об оппоненте
 по диссертационной работе **Каменева Дмитрия Геннадьевича**
 на тему «**Исследование рекомбинантного силикатеина LoSilA1 и катепсина LoCath**
морской губки *Latrunculia oparinae*»
 представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
 специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия Имя Отчество	Балабанова Лариса Анатольевна
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	03.01.04 - биохимия
Ученая степень и отрасль науки	К.б.н.
Ученое звание	-
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
Занимаемая должность	С.н.с.
Почтовый индекс, адрес	690022, г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159
Телефон	231-07-03
Адрес электронной почты	balaban@piboc.dvo.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>2015. Balabanova L. Genetically modified proteins: functional improvement and chimeragenesis [Text] : http://www.tandfonline.com/loi/kbie20 / L. Balabanova, V. Golotin, A. Podvolotskaya, V. Rasskazov // Bioengineered. - 2015. - Vol. 6 № 5. - С. Р. 262-274</p> <p>2015. Балабанова Л. А. Рекомбинантная alpha-N-ацетилгалактозаминидаза морской бактерии, модифицирующая детерминанты A-эритроцитов [Текст] / Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (Владивосток) // Acta Naturae. - 2015. - Т. 7 № 1. - С. 124-127</p> <p>2015. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Ковальчук С.Н., Черников О.В., Чикаловец И.В., Рассказов В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40<i>CmAP/CGL</i>, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид <i>CmAP/CGL</i> со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы <i>CmAP</i> и галактозоспецифичного лектина <i>CGL</i>, рекомбинантный штамм <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)/pET40<i>CmAP/CGL</i> – продуцент гибридного бифункционального полипептида <i>CmAP/CGL</i> и способ его получения // Патент РФ RU №2557306, 20.07.2015, Бюл. № 20.</p>

2014. Balabanova L. A. A Novel Bifunctional Hybrid with Marine Bacterium Alkaline Phosphatase and Far Eastern Holothurian Mannan-Binding Lectin Activities [Text] / L. A. Balabanova, V. A. Golotin [et al.] // Plos One. - 2014. - Vol. 9 № 11. - C. P. e112729 [1-11]

2014. Balabanova L. Recombinant chimeric bifunctional proteins with alkaline phosphatase activity of marine bacterium *Cobetia marina* for the assessment of lectin-binding patterns [Text] / L. Balabanova, V. Golotin [и др.] // FEBS Journal. - 2014. - Vol. 281. C. P. 418.

2012. Balabanova L. A. An extracellular S1-Type Nuclease of Marine Fungus *Penicillium melinii* [Text] / L. A. Balabanova, Yu. M. Gafurov, M. V. Pivkin, N. A. Terentyeva, G. N. Likhatskaya, V. A. Rasskazov // Marine Biotechnology. - 2012. - Vol. 14 № 1. - C. P. 87-95

2014. Bakunina I. Yu., Balabanova L. A., Pennacchio A., Trincone A. Hooked on α -D-lactosidases: from biomedicine to enzymatic synthesis // Critical Reviews in Biotechnology. - 2014. - Vol. , N. - P. [1-13].

2015. Golotin V. A. Recombinant Production and Characterization of a Highly Active Alkaline Phosphatase from Marine Bacterium *Cobetia marina* [Text] / V. A. Golotin, L. A. Balabanova, G. N. Likhatskaya, V. A. Rasskazov // Marine Biotechnology. - 2015. - Vol. 17. - C. P. 130-143

2015. Kovalchuk S. N. Carbohydrate-binding motifs in a novel type lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*: homology modeling study and site-specific mutagenesis [Text] : www.elsevier.com/locate/fsi / S. N. Kovalchuk // Fish & Shellfish Immunology. - 2015. - Vol. 47. - C. P. 565-571

2014. Лихацкая Г. Н. Моделирование пространственной структуры лектина голотурии и его комплексов манноолигосахаридом [Текст] / Г. Н. Лихацкая, А. А. Булгаков, Л. А. Балабанова, В. А. Голотин, В. А. Рассказов, Е. В. Трифонов, Г. В. Тарасов, Е. А. Нурминский

// Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии. - 2014. - С. 1-4

2014. Nedashkovskaya O. I. Flavobacterium ahnfeltiae sp. nov., a new marine polysaccharide-degrading bacterium isolated from a Pacific red alga [Text] / O. I. Nedashkovskaya, L. A. Balabanova, N. V. Zhukova, S. J. Kim, I. Y. Bakunina, S. K. Rhee // Arch. Microbiol. - 2014. - Vol. 196 № 10. - С. p. 745-752

2014. Kiseleva M. I. Effect of treatment of chum salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum) eggs with 1,3;1,6-beta-D-glucans on their development and susceptibility to *Saprolegnia* infection [Text] / M. I. Kiseleva, L. A. Balabanova, L. A. Elyakova, V. A. Rasskazov, T. N. Zvyagintseva // Journal of Fish Diseases. - 2014. - Vol. 37. - С. P. 3-10

2014 Bakunina I. Yu. Stereochemical course of hydrolytic reaction catalyzed by alpha-galactosidase from cold adaptable marine bacterium of genus *Pseudoalteromonas* [Text] / I. Yu. Bakunina, L. A. Balabanova, V. A. Golotin, L. V. Slepchenko, V. V. Isakov, V. A. Rasskazov // Frontiers in Chemistry. - 2014. - Vol. 2.- Art.89P. [1-6]

2013. Bakunina I. Comparative analysis of glycoside hydrolases activities from phylogenetically diverse marine bacteria of the genus *Arenibacter* [Text] / I. Bakunina, O. Nedashkovskaya, L. Balabanova, T. Zvyagintseva, V. Rasskasov, V. Mikhailov // Marine Drugs. - 2013. - Vol. 11. - С. P. 1977-1998

Верно

Должность и
заверяющего

Анкетные данные
УДОСТОВЕРЯЮ
Начальник ОК
Исполнительный директор
15 декабря 2015 г.

Бориса Ивановича
Иванова

Фамилия И. О.

«15» декабря 2015 г.

