

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**о диссертационной работе Авраменко Татьяны Викторовны
«Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах
растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC*»,
представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).**

Диссертационная работа Авраменко Татьяны Викторовны выполнена в актуальной области современной науки – биотехнологии растений – и посвящена исследованию регуляторного влияния агробактериальных генов *rol* на биосинтез и активность растительных пероксидаз III класса в клеточных культурах растений.

В качестве объектов исследования диссертантом выбраны клеточные культуры трех лекарственных растений: марены сердцелистной *Rubia cordifolia*, золотого корня *Rhodiola rosea* и смолевки обыкновенной *Silene vulgaris*. Уникальность и актуальность выбранных объектов очевидна. Ареал распространения лекарственного растения марены сердцелистной в России ограничен только Восточной Сибирью (Ангаро-Саянский и Даурский районы) и Дальним Востоком (Приамурье, Приморье), тогда как золотой корень встречается в заполярных и горных районах нашей страны и включен в красную книгу.

Исследования ферментов-пероксидаз имеют более чем вековую историю, с момента экспериментального доказательства перекисной теории биологического окисления, сформулированной российским биохимиком Алексеем Николаевичем Бахом в начале XIX столетия. С тех пор были открыты, частично очищены и охарактеризованы множество пероксидаз растений, грибов, бактерий. Гомогенный препарат пероксидазы был впервые получен из корней хрена несколько десятилетий спустя с момента признания теории, а аминокислотная последовательность этой пероксидазы была установлена только в 1979 году. В 1997 году была решена кристаллическая структура рекомбинантной пероксидазы из этого растения, и только тогда был

окончательно установлен механизм гетеролитического расщепления перекиси водорода с ее восстановлением молекулой фенольного субстрата под действием данного фермента.

Интерес к изучению пероксидаз и их использованию возрастает на современном уровне развития научных знаний и методологий. Значительные успехи в изучении этой группы ферментов и процессов, в которых они участвуют, достигнуты с появлением новых аналитических методов, инструментальных методов белковой химии, особенно методов молекулярной биологии, генной инженерии, позволяющих получать рекомбинантные формы ферментов в большом количестве. Прогрессу способствовало, также, развитие современных теоретических методов биоинформатики, позволяющих анализировать и систематизировать результаты структурных исследований.

Пероксидазы находят практическое применение в иммуноферментных диагностических наборах. На основе рекомбинантных пероксидаз разрабатывают высокочувствительные биосенсоры, предназначенные для определения различных соединений в сложных многокомпонентных смесях. В последние годы на рынке появляются все новые и новые препараты нативных и рекомбинантных пероксидаз из различных источников (бактерий, грибов и растений).

В задачи диссертационной работы Авраменко Татьяны Викторовны входило выделение и идентификация полноразмерных последовательностей генов, кодирующих пероксидазы III класса, в нативных клеточных культурах растения *R. cordifolia* и в их трансгенных формах, полученных модификацией агробактериальными генами *rolB* и *rolC* (1); идентификация структур изоформ пероксидаз *R. cordifolia* и их филогенетический анализ (2); определение активности и изоферментного состава пероксидаз в нативных и ген-трансформированных культурах клеток вышеназванного растения, в культурах клеток, подвергшихся влиянию внешних и внутренних биогенных и абиогенных факторов, а также в культурах клеток еще двух растений *R. rosea* L. и *S. vulgaris* (M.) G., модифицированных геном *rolB* (3).

Диссертационная работа Авраменко Татьяна Викторовна изложена на 121 странице, содержит 9 таблиц и 14 рисунков. Список цитируемой литературы включает 290 статей.

Диссертация построена по традиционному плану: введение, обзор литературы (25 стр.), глава, описывающая материалы и методы исследования (11), результаты и обсуждение (34 стр.), заключение, выводы, список использованных сокращений и список цитируемой литературы.

В главе «Литературный обзор» диссертант знакомит с природной системой фитопатогенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*, которая применяется в настоящее время для трансформации высших растений; дает характеристику функций агробактериальных генов *rol*, их влияния на защитную систему клетки; описывает роль PR белков и активных форм кислорода в патогенезе растений.

Три раздела в главе «Литературный обзор» диссертант посвящает растительным пероксидазам III класса, структурным и каталитическим особенностям этих ферментов. Подробно останавливается на роли и функциях пероксидаз в растениях, а также описывает области практического применения этих ферментов. Язык и стиль изложения лаконичный, вместе с тем, встречаются так называемые англицизмы, длинные предложения с множеством запятых, единичные опечатки и стилистические «некрасивости».

В главе «Обсуждение результатов» последовательно изложена вся стратегия и тактика проделанной работы. От культивирования растений, клеточных культур и трансгенных форм культур клеток, диссертант подходит к выделению и идентификации генов и воспроизведению аминокислотных последовательностей растительных пероксидаз III класса. Выполняет их филогенетический анализ, изучает влияния ряда абиогенных факторов, вызывающих у растения стресс, на экспрессию различных изоформ растительных пероксидаз в нативных и трансгенных культурах клеток уникальных растений.

Завершается диссертация главой «Заключение», в которой диссертант суммирует результаты проделанной работы, объясняет их практическое и познавательное значение.

В общих чертах, диссертация Татьяны Владимировны представляет собою исчерпывающее фундаментальное исследование. Диссертантом проделана многоплановая и многотрудная работа. Идентифицированы семь полноразмерных последовательностей генов, кодирующих пероксидазы III класса у *R. cordifolia*. На базе биоинформатического анализа воспроизведенных аминокислотных последовательностей получены данные о физико-химических свойствах и локализации этих энзимов в клетке культуры, установлена высокая гомология с известными пероксидазами других растений. Выполнен детальный филогенетический анализ воспроизведенных аминокислотных последовательностей этих пероксидаз и еще 57 аминокислотных последовательностей подобных ферментов из других растений. Достоверно показано, что шесть пероксидаз *R. cordifolia* кластеризуются на «древо» в соответствии с содержанием аминокислотных остатков в определенных позициях и с заменами функционально-значимых аминокислотных остатков. Пероксидаза RcPrx07 найдена в подкластере белков, имеющих особенный структурный фрагмент, напоминающий сайт связывания иона Ca^{2+} и кальмодулина.

Диссертантом проведено исследование культуры клеток *R. cordifolia*, трансформированных онкогенами *rolC*, *rolB*, как под контролем собственных промоторов, так и промоторов в составе дикого штамма A4 *A. rhizogenes*. Нельзя не согласиться с автором, что только сверхэкспрессия онкогена *rolB* приводит к активации экспрессии генов пероксидаз *RcPrx01—RcPrx07* в десятки и сотни раз. В результате значительно увеличивается общая пероксидазная активность и количество изоформ ферментов. Установлена положительная корреляция между *rolB*-индуцируемой активацией растительных пероксидаз III класса в культуре клеток *R. cordifolia* и уровнем

экспрессии трансгена. Эта корреляция сохраняется во всех фазах роста клеточной культуры в течение одного пассажа.

Впечатляет масштаб выполненного эксперимента по определению общей активности и изоферментного состава пероксидаз, который Татьяна Викторовна выполнила исключительно самостоятельно. Остальные важные этапы работы (филогенетический и статистический анализы, определение уровня экспрессии генов и уровня активных форм кислорода) были осуществлены совместно и/или с помощью старших коллег и руководителя диссертации. Эксперименты выполнены аккуратно. Сходимость полученных результатов свидетельствуют о хорошем уровне экспериментаторского мастерства, анализ полученных результатов – о научной квалификации диссертанта. Сильной стороной работы является часть, посвященная биоинформатическим исследованиям и филогенетическому анализу пероксидаз *R. cordifolia*.

Глава «Материалы и методы» содержит все необходимые сведения для воспроизведения эксперимента. В своем многоплановом исследовании автор использовал обширный арсенал современных лицензионных материалов и методов:

1. Методы генной инженерии и молекулярной биологии (амплификации и полимеразно-цепной реакции в реальном времени), позволяющие определять изменения в транскриптоме растения;

2. Аналитические методы электрофореза полинуклеотидов и изоэлектрофокусирования нативных белков;

3. Метод конфокальной микроскопии;

4. Результаты экспериментов анализировали с помощью современного лицензионного компьютерного программного обеспечения, а также с помощью интерактивных программ, размещенных на известных международных серверах.

Разработанный подход, касающийся идентификации индивидуальных форм пероксидаз, имеет прикладное значение и может быть использован в

генной инженерии для создания трансгенных растений, устойчивых к определенным стрессовым факторам, а в биотехнологии – для производства функционально активных различных растительных ферментов-пероксидаз. Это является ключевым достижением работы Татьяны Владимировны.

Таким образом, Татьяна Владимировна с поставленными перед ней задачами справилась. Полученные результаты не вызывают сомнений. Однако диссертация не лишена недостатков, касающихся, главным образом, стиля изложения материала и оформления рукописи диссертации, которые затрудняли чтение и понимание представленного материала.

- Диссертант не дает описания растений, которые исследуются в этой работе. Чем растения интересны, каковы их лекарственные свойства и как давно известны, где они произрастают. Не подчеркнута редкость и уникальность этих растений.

- Полные латинские названия растений приведены диссертантом только во «Введении», а не как принято, полностью в начале каждой главы.

- В литературном обзоре не помешал бы иллюстрационный материал: рисунки известных процессов инфицирования растений; структуры пероксидаз, схемы реакций, катализируемых пероксидазами, обобщающие таблицы и т.п. Кроме того, недостает сведений о современной классификации пероксидаз по семействам в соответствии с аминокислотной последовательностью, структурной укладкой молекулы белка.

- Не дано определение активности фермента, как это принято. Для большей убедительности нужно было бы привести реакцию, которую катализирует фермент, показать, как определяли скорость реакции, формулу, по которой вели расчет активности.

- Размерность коэффициента экстинкции (ϵ_{593}) - $M^{-1} \times cm^{-1}$ - выглядит странно – нкатал $\times M^{-1} \times cm^{-1}$ (стр. 46).

- Термин «молекулярный вес» белка (таблица 3, стр. 50) не общепринят, используется термин «молекулярная масса».

- В таблице 5 латинские названия растений нужно было дать полностью, как это принято.

- В русском языке союз «поэтому» (стр. 6) и слово «однако» в роли союза (стр. 14, 24, 27, 31, 71) запятыми с правой стороны не выделяются.

- Стремление к лаконичности привело в некоторых случаях к снижению качества изложения материала. Например, рисунок 5 иллюстрирует стационарное состояние активных форм кислорода в культурах нормальных и трансгенных клеток марены сердцелистной. В подписи к этому рисунку не указано, каким методом получены картинки, каким методом визуализированы, и что отражает диаграмма в нижнем правом углу. Хотя в статье (Bulgakov V.P., et al., 2011.), соавтором которой является диссертант, дана исчерпывающая подпись к этому рисунку.

- В русскоязычных публикациях принято использовать запятую для отделения десятичной части числа. Нет единообразия – чаще встречается точка, а иногда – запятая.

- Нарушена последовательность нумерации рисунков. На странице 70 сначала упоминается рис. 11, а затем 10, хотя рис. 10 помещен на стр. 72, а рис. 11 – на стр. 77.

- В главе «Материалы и методы», для удобства чтения, описание материалов хорошо было бы суммировать в отдельном абзаце.

- При использовании терминов нужно быть более точным. Например: «Анализ Пирсона показал» (стр. 66). В статистике существует понятие «корреляция Пирсона, коэффициент корреляции Пирсона», иногда используют – «корреляционный анализ Пирсона». Нужно указывать, о перекиси какого соединения идет речь на стр. 20 (строка 10, 14, 24 сверху).

- Не закончена подпись к рис. 3 в Автореферате.

По ходу чтения диссертации возникли следующие вопросы:

1. Можно ли предположить, что пероксидазы класса III *R. cordifolia* относятся различным структурным подсемействам?

2. Возникло сомнение в правильности употребления термина «изоформа» пероксидазы. «Изоформа» и «молекулярная форма» – это синонимы в контексте данной диссертации? Чем молекулярная форма отличается от изоформы фермента?

3. Филогенетическое дерево пероксидаз построено с использованием трех методов: ML (максимального правдоподобия), MP (максимальной экономии) и NJ (ближайших соседей). Значения бутстрепа, рассчитанные на основании этих критериев, заметно различаются. В некоторых узлах на «древе» указано отсутствие значений бутстрепа для одного или двух таких критериев. В диссертации этот результат не обсуждается. Что можно сказать по этому поводу?

4. Есть ли пероксидазы других классов (I и II) в марене сердцелистной?

В заключение еще раз стоит подчеркнуть, что автором выполнено современное исследование, актуальное как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения. Немаловажно, что вся работа выполнена в стенах института и конкретно в лаборатории биоинженерии БПИ ДВО РАН, которая имеет высокий авторитет в данном направлении исследования, как в России, так и в Мировой науке.

Автореферат и опубликованные материалы отражают основное содержание работы. Список публикаций по теме диссертации состоит из 10 наименований, в том числе, 3-х статей, опубликованных в международных рейтинговых рецензируемых журналах, а также 7 тезисов докладов, представленных на международных, всероссийских и региональных конференциях.

На основании вышеизложенного считаю, что Авраменко Татьяна Викторовна является сложившимся специалистом в области биотехнологии культуры клеток. Диссертационная работа Авраменко Татьяны Викторовны «Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC*» по объему выполненного эксперимента, новизне полученных результатов, их научной и практической

Сведения об оппоненте
 по диссертационной работе **Авраменко Татьяны Викторовны**
 на тему «**Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC***»
 представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия Имя Отчество	Бакунина Ирина Юрьевна
Шифр и наименование специальностей, по которым защищена диссертация	02.00.10 – биоорганическая химия
Ученая степень и отрасль науки	Доктор химических наук; химические науки
Ученое звание	Старший научный сотрудник, доцент
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН
Занимаемая должность	Ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов
Почтовый индекс, адрес	690022, Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159
Телефон	8 (423) 231-07-05
Адрес электронной почты	baku@list.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Запорожец Т.С., Макаренко И.Д., Бакунина И.Ю., Бурцева Ю.В., Кусайкин М.И., Балабанова Л.А., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н., Рассказов В.А. Действие гликозид гидролаз из морских гидробионтов на адгезию <i>S. diptheriae</i> к буккальному эпителию. Биомедицинская химия. 2010. Т. 56. N. 3, С. 350-358. 2. Kovalchuk S.N., Bakunina I.Y., Burtseva Y.V., Emelyanenko V.I., Kim N.Y., Guzev K.V., Kozhemyako V.B., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. An endo-(1-->3)-beta-D-glucanase from the scallop <i>Chlamys albidus</i>: catalytic properties. cDNA cloning and secondary-structure characterization. Carbohydrate Research. 2009. Vol. 344, No.1. P.191-197. 3. Balabanova L.A., Bakunina I.Y., Nedashkovskaya O.I., Makarenkova I.D., Zaporozhets T.S., Besednova N.N., Zvyagintseva T.N., Rasskazov V.A. Molecular characterization and therapeutic potential of a marine bacterium <i>Pseudoalteromonas</i> sp. KMM 701 alpha-galactosidase. Marine Biotechnology. 2010. Vol 12, No. 1. P. 111-120. 4. V. Ya. Fedorova, E. L. Chaikina, I. Yu. Bakunina, S. D. Anastyuk, V. V. Isakov, M. M. Anisimov, T. N. Zvyagintseva. Effect of 1,3;1,6-β-D-glucan and the products of its enzymatic transformation on the formation of germs of buckwheat <i>Fagopyrum esculentum</i> Monch. Rus. J. Bioorgan. Chem. 2010. Vol. 36, No. 7. P. 934-940. 5. Бакунина, И. Ю., Недашковская О. И., Ким С. Б., Звягинцева Т. Н., Михайлов В. В. Распространенность α-N-ацетилгалактозаминидаз среди морских бактерий филума <i>Bacteroidetes</i>, эпифитов морских водорослей Охотского и Японского морей. Микробиология. 2012. Т.81. №3, С.403-409. 6. Бакунина И.Ю., Недашковская О. И., Ким С. Б., Звягинцева Т. Н., Михайлов В. В. Разнообразие гликозидазных активностей бактерий филума <i>Bacteroidetes</i>, изолированных из морских водорослей // Микробиология. 2012. Т. 81, № 6. С. 745-753. 7. Ермакова С.П., Иванова Е.П., Бакунина И.Ю., Михайлов В.В., Звягинцева Т.Н. Влияние метаболитов бурых водорослей на синтез О-гликозилгидролаз бактериями, деградирующими таллом <i>Fucus evanescens</i> // Микробиология, 2012. т.Т. 81, № 3. С.396-402. 8. Bakunina I, Nedashkovskaya O, Balabanova L, Zvyagintseva T, Rasskasov V, Mikhailov V. Comparative analysis of glycoside hydrolases activities from 	

- Phylogenetically Diverse Marine Bacteria of the Genus *Arenibacter*. *Mar. Drugs* 2013, 11, 1977-1998.
9. Stereochemical course of hydrolytic reaction catalyzed by alpha-galactosidase from cold adaptable marine bacterium of genus *Pseudoalteromonas*. *Frontiers in chemistry/Chemical Biology*, V 2, p. 1-6, DOI: 10.3389/fchem.2014.00089
 10. O.I. Nedashkovskaya, L.A. Balabanova, N.V. Zhukova, So Jeong Kim, I.Y. Bakunina, Sung Keun Rhee. *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov., a new marine Polysaccharide degrading bacterium isolated from a Pacific red alga. *Arch. Microbiol.* 2014, 196, 745–752.
 11. I.Yu. Bakunina, L.A. Balabanova, A. Pennacchio, A. Trincone. Hooked on alpha-D-galactosidases: from biomedicine to enzymatic synthesis. *Crit Rev Biotechnol*, Early Online: 1–13 Inc. DOI: 10.3109/07388551.2014.949618 ISSN: 0738-8551 (print online 2015).
 12. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Бакунина И.Ю., Слепченко Л.В., Исаков В.В., Подволоцкая А. Б., Рассказов В. А. Рекомбинантная α -N-ацетилгалактозаминидаза морской бактерии, модифицирующая детерминанты А-эритроцитов. *Acta Naturae*. 2015. Т. 7, № 1. С. 124–127.
 13. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А., Голотин В.А., Белик А.А., Бакунина И.Ю., Диденко Л.В., Рассказов В.А. Влияние ферментов на формирование бактериальных биопленок. *Здоровье. Медицинская экология. Наука* Т: 60, № 2, Г 2015, С. 86-94.
 14. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Бакунина И.Ю., Рассказов В.А. Плазмида 40NaGal, определяющая синтез α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal, штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/40NaGal – продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal, и способ ее получения. Заявка: 2013112996/10, 22.03.2013 20.08.2014 Бюл. № 23 Ru 2525 682 C1.
 15. Балабанова Л.А., Голотин В. А., Бакунина И. Ю., Рассказов В. А. Плазмида 40Gal, определяющая синтез α -галактозидазы α -PsGal, штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal – продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal, и способ ее получения. Заявка: 2012142209/10, 03.10.2012 опубликован, Бюл. № 2 20.01.2014 Ru 2504583 C1

Верно

Ученый секретарь ТИБОУ

Д.х.н.

Красикова И.Н.

«11» декабрь 2015 г.

