

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Доценко Анны Сергеевны «Белковая инженерия сайтов N-гликозилирования целлюлаз мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Белковая инженерия ферментов является эффективным способом изменения их каталитических и биохимических свойств. Различные подходы белковой инженерии также применяются для определения роли отдельных аминокислотных остатков или элементов структуры для проявления свойств ферментов, изучения механизмов ферментативных реакций. Одними из ферментов, свойства которых интенсивно исследуются и улучшаются с использованием белковой инженерии, являются целлюлолитические ферменты.

Актуальность работ, посвященных белковой инженерии целлюлаз, определяется использованием этих ферментов в процессах биотехнологической переработки возобновляемого растительного сырья. Биотехнологическая переработка растительного сырья позволяет получать такие коммерчески значимые продукты, как органические спирты и кислоты, углеводы и углеводороды, биотопливо и биопластики. При этом ключевой начальной стадией является гидролиз полисахаридных компонентов под действием ферментных препаратов с образованием смесей моно- и олигосахаридов. Поскольку одними из основных действующих компонентов используемых ферментативных препаратов являются целлюлазы, исследование и улучшение их свойств представляет не только несомненный фундаментальный, но и прикладной интерес.

Целлюлолитические ферменты в значительной степени гликозилированы. Известно, что гликозилирование оказывает влияние на все стадии формирования, секреции и проявления активности ферментов. Тем не менее, до настоящего времени роль N-гликозилирования в проявлении каталитических и биохимических свойств целлюлаз остается малоизученной.

Целью диссертационной работы Доценко А.С. было изучение влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства трёх целлюлаз, секретируемых *Penicillium verruculosum*, высокоактивным промышленным продуцентом целлюлолитических ферментов: целлобиогидролазы I (ЦБГИ), целлобиогидролазы II

(ЦБГII) и эндоглюканазы II (ЭГII). Следует отметить грамотность выбора объектов исследования. ЦБGI, ЦБGII и ЭГII *P.verruculosum* относятся к различным семьям гликозид-гидролаз (7, 6 и 5-й соответственно), характеризуются различной субстратной специфичностью и практически полностью отражают разнообразие ферментов, образующих целлюлолитический комплекс. Таким образом, изучение влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства ферментов ЦБGI, ЦБGII и ЭГII позволяет расширить представления о механизме действия и субстратной предпочтительности целлюлаз, относящихся к 7, 6 и 5-й семьям гликозид-гидролаз. Кроме того, ЦБGI, ЦБGII и ЭГII являются основными компонентами ферментного комплекса, секретируемого *P.verruculosum*, поэтому получение мутантных форм этих ферментов с улучшенными свойствами позволит создать более эффективные, чем используемые сегодня, целлюлазы для практического применения.

Научная новизна работы состоит в систематическом исследовании N-гликозилирования целлюлаз ЦБGI, ЦБGII и ЭГII *P.verruculosum*. В работе Доценко А.С. были определены тип и структура N-связанных гликанов ЦБGI, ЦБGII и ЭГII *P.verruculosum*, как в их нативных, так и в рекомбинантных формах, экспрессированных в *P.verruculosum* и *P.canescens*. Показано, что N-связанные гликаны целлюлаз *P.verruculosum* представляют собой высокоманнозные олигосахаридные цепи, как и N-связанные гликаны целлюлаз, секретируемые штаммами родов *Aspergillus* и *Trichoderma*. Это может свидетельствовать об одинаковых механизмах гликозилирования в штаммах этих родов.

Впервые осуществлена белковая инженерия сайтов N-гликозилирования целлюлаз ЦБGI, ЦБGII и ЭГII *P.verruculosum*. Суть работы заключалась в осуществлении сайт-направленного мутагенеза сайтов N-гликозилирования ЦБGI, ЦБGII и ЭГII *P.verruculosum*, получении мутантных форм и определении каталитических и биохимических свойств мутантных форм ЦБGI, ЦБGII и ЭГII с измененными сайтами N-гликозилирования. В работе Доценко А.С. показано, что изменение степени N-гликозилирования в результате удаления одного из сайтов N-гликозилирования не приводит к изменению термостабильности и значений температурных оптимумов каталитической активности. рН-Оптимумы каталитической активности также не менялись в случае ЦБGI и ЦБGII, а в случае ЭГII – менялись незначительно. При этом значительно изменялась каталитическая активность исследованных целлюлаз: белковая инженерия различных сайтов N-гликозилирования приводила как к увеличению, так и к уменьшению активности.

В случае ЦБGI и ЦБGII удаление N-связанных гликанов, расположенных у входа в активный центр ферментов, позволило увеличить их каталитическую активность, а

удаление N-связанных гликанов, расположенных вдоль активного центра ферментов (то есть между молекулой фермента и поверхностью нерастворимого субстрата) приводило к уменьшению активности, что в работе Доценко А.С. объясняется участием N-связанных гликанов в реализации процессивного механизма гидролиза. Следует отметить, что в литературе для ряда целлюбиогидролаз, секретируемых штаммами родов *Trichoderma* и *Penicillium*, реализация этого механизма обсуждается и доказывается с использованием биохимических методов и методов компьютерного моделирования. Однако в диссертационной работе данный вывод основывается только на исследованиях кинетики гидролиза и степени адсорбции ферментов на микрокристаллической целлюлозе. Дополнительные исследования, проведенные в соответствии с опубликованными методиками определения процессивности целлюбиогидролаз, сделали бы этот вывод более обоснованным. В случае ЭГП удаление N-связанных гликанов, расположенных как у входа, так и у выхода из активного центра, позволило увеличить каталитическую активность фермента. Также было показано, что изменение степени N-гликозилирования ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum* не оказывает значительного влияния на степень синергизма при действии этих ферментов на целлюлозосодержащие субстраты (микрокристаллическая целлюлоза и измельченная древесина осины).

Практическое значение имеет получение мутантных форм ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП *P.verruculosum* с увеличенной каталитической активностью и определение компонентного состава смесей ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГП, обладающих наибольшей гидролитической способностью по отношению к различным целлюлозосодержащим субстратам. Полученные результаты могут быть использованы для разработки нового поколения мутантных штаммов на основе грибов рода *Penicillium*, промышленных продуцентов целлюлаз, для применения в процессах биотехнологической переработки возобновляемого растительного сырья.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на специализированных отечественных и международных конференциях и изложены в 10 публикациях, в том числе в 4 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 6 тезисах докладов.

Структура диссертации. Диссертационная работа Доценко А.С. состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы (214 источников) и приложение. Работа изложена на 166 страницах, включает 64 рисунка, 21 таблицу и 3 приложения.

«Введение» содержит обоснование актуальности работы, цель и задачи работы, также приведены выводы, научная и практическая значимость полученных результатов.

Глава «Обзор литературы» состоит из 5 разделов и включает в себя описание свойств растительного сырья, принципов биотехнологической переработки сырья, описание биохимических и каталитических свойств целлюлаз, генно-инженерных подходов для улучшения этих свойств. В обзоре также рассмотрена роль гликозилирования в структуре и функции изучаемых ферментов. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние проблемы по теме диссертации и позволяет обосновать цель исследования.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе реагенты и материалы, а также экспериментальные протоколы проведённых экспериментов. Применение современных методов биоинформатики, молекулярной биологии, аналитической химии и биохимии позволило получить объективные и достоверные результаты.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 5 разделов. В разделе 1 описывается общая схема проведения исследований, что позволяет изначально структурировать изложение результатов и значительно облегчает восприятие материала. Разделы 2, 3 и 4 посвящены белковой инженерии ЭГП, ЦБГП и ЦБГП *P.verruculosum*, соответственно. Раздел 5 посвящен исследованию гидролитической способности различных двойных и тройных смесей исследованных целлюлаз.

Для определения сайтов N-гликозилирования был проведен анализ аминокислотных последовательностей исследованных целлюлаз и компьютерное моделирование их трёхмерных структур. В структурах ЭГП, ЦБГП и ЦБГП *P.verruculosum* было обнаружено соответственно 3, 4 и 4 теоретических сайта N-гликозилирования: N19, N42 и N194 в ЭГП; N219, N265, N279 и N395 в ЦБГП; N45, N194, N388 и N430 в ЦБГП. Компьютерное моделирование позволило подтвердить, что в случае ЦБГП и ЦБГП все сайты расположены на поверхности белковой глобулы и могут быть доступны для гликозилирования, в случае ЭГП два из трех сайтов оказались расположены на поверхности, один – внутри белковой глобулы. Следует отметить основательность проведенного анализа аминокислотных последовательностей и компьютерного моделирования. Кроме сайтов гликозилирования были определены остатки, значимые для проявления каталитической активности и взаимное расположение этих остатков и сайтов гликозилирования. Вместе с тем, при сравнении свойств мутантных и немутантных форм целлюлаз и обсуждении результатов используется только метод компьютерного моделирования, но не множественное выравнивание.

Сайты N-гликозилирования также были определены масс-спектрометрическим анализом. Данный метод был использован также для определения структуры N-связанных гликанов. В случае ЭГП гликозилирование было детектировано для сайтов,

расположенных на поверхности белковой глобулы (сайты N42 и N194), в случае ЦБГII – для всех сайтов (N219, N265, N279 и N395), в случае ЦБГI – для трех из четырех сайтов (N45, N194 и N388). В случае всех целлюлаз N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$. Следует отметить, что мутантная форма ЦБГI N430A не была выделена. Для определения причин отсутствия этой формы в составе секретируемого комплекса были проведены исследования по внутриклеточной экспрессии, показавшие отсутствие мутантной формы внутри клеток.

По биохимическим свойствам все выделенные мутантные формы ЭГII, ЦБГII и ЦБГI практически не отличались от немутантных форм. рН-Профили относительной активности мутантных и немутантных форм в случае ЦБГII и ЦБГI оказались одинаковыми, в случае ЭГII – удаление N-связанных гликанов привело к сдвигу рН-оптимума на 0,5 ед. в нейтральную область. Температурные профили активности, как и термостабильность, оказались одинаковыми для мутантных и немутантных форм ЭГII, ЦБГII и ЦБГI.

Каталитическая активность мутантных форм исследованных целлюлаз значительно отличалась от активности немутантных форм, только некоторые из осуществленных мутаций приводили к увеличению активности. В случае ЭГII удаление сайтов, расположенных по обе стороны от активного центра, привело к увеличению каталитической активности: мутация N42A привела к увеличению активности на 12% по отношению к β -глюкану и на 10% по отношению к карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ). Мутация же N194A привела к увеличению активности на 35% по отношению к β -глюкану и на 29% по отношению к КМЦ. В случае ЦБГII удаление сайтов, расположенных у входа в активный центр, привело к увеличению активности: мутация N219A привела к увеличению активности на 26% по отношению к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) и на 29% по отношению к КМЦ, а мутация N265A привела к увеличению активности на 16% по отношению к МКЦ и на 10% по отношению к КМЦ. В случае ЦБГI удаление сайта, расположенного у входа в активный центр, привело к увеличению активности: мутация N45A привела к увеличению активности на 10% по отношению к МКЦ и на 150% по отношению к КМЦ. В соответствии с трехмерными моделями исследованных целлюлаз сайт N45 в структуре ЦБГI, как и сайты N219 и N265 в структуре ЦБГII, расположен у входа в «туннель» активного центра, а сайты N42A и N194A в структуре ЭГII расположены по обе стороны от активного центра. Таким образом, гликаны, расположенные рядом с активным центром, могут влиять на проявление каталитической активности, вероятно, за счет образования водородных связей с субстратом.

Двойные и тройные смеси мутантных форм ЭГII, ЦБГII и ЦБГI характеризовались большей гидролитической способностью по сравнению с немутантными формами при гидролизе различных целлюлозосодержащих материалов (МКЦ, измельченная древесина осины). Использование мутантных форм позволило на 20-40% увеличить выход глюкозы по сравнению с немутантными формами. При этом наибольшей гидролитической способностью обладали тройные смеси ЦБГI, ЦБГII и ЭГII с компонентным составом 20-60% – 20-60% – 20%, что соответствует компонентному составу ФП, используемым для биоконверсии растительного сырья.

Выводы обоснованы и подтверждены результатами экспериментальных исследований. Автореферат диссертации оформлен аккуратно и содержит изложение основных результатов исследований, заключений и выводов, содержащихся в диссертационной работе.

По диссертации Доценко А.С. есть замечания:

- 1) Отсутствуют исследования, посвященные определению процессивности целлобиогидролаз.
- 2) Помимо сведений о термостабильности мутантных и немутантных форм целлюлаз несомненный интерес представляли бы сведения об их операционной стабильности.
- 3) При проведении масс-спектрометрического анализа гидролиз ферментов осуществлялся под действием различных, в том числе неспецифичных, протеаз, что затрудняло идентификацию пиков. Было бы надежнее осуществлять гидролиз под действием трипсина и проводить анализ пиков, соответствующих триптическим пептидам.
- 4) В автореферат следовало бы поместить пример масс-спектров, полученных в процессе масс-спектрометрического анализа, а также пример хроматограмм и электрофореграмм, полученных в процессе выделения и очистки белков (эти иллюстрации есть в диссертации).
- 5) В диссертации и автореферате следовало бы нарисовать структуры использованных низкомолекулярных субстратов и ключевых структурных фрагментов полисахаридных субстратов, что сделало бы более наглядным обсуждение гидролизуемых типов гликозидных связей.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Доценко А.С., которая является законченной научно-квалификационной работой, содержащей сведения о влиянии N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства целлюлаз ЦБГI, ЦБГII и ЭГII *P. verruculosum*,

относящихся к 7, 6 и 5-й семьям гликозид-гидролаз, соответственно. В работе получены данные, имеющие значение для фундаментальных исследований целлюлолитических ферментов, а также для практического применения этих ферментов и создания эффективных биокатализаторов для биоконверсии возобновляемого растительного сырья.

Представленная диссертация соответствует требованиям пп. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней (утверждено постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842), а ее автор, **Доценко Анна Сергеевна**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующий лабораторией
химии гликоконъюгатов ИОХ РАН
д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН

Н.Э. Нифантьев

специальность – 02.00.03 – органическая химия.

Почтовый адрес 119991 Москва, Ленинский пр. 47

Телефон +7-(499)1356390

Адрес электронной почты nen@ioc.ac.ru

Наименование организации (полное/сокращенное) – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

06.11.2016 год

Подпись чл.-корр. РАН Н.Э. Нифантьева заверяю:

Ученый секретарь ИОХ РАН, к.х.н.



И.К. Коршевец