

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН»,  
чл-корр. РАН



А.М. Боронин

«11» октября 2016 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Диссертационная работа Доценко А.С. посвящена исследованию влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства целлюлаз целлобиогидролазы I (ЦБГИ), целлобиогидролазы II (ЦБГИI) и эндоглюканазы II (ЭГИI), секретируемых высокоактивным промышленным продуцентом целлюлолитических ферментов *Penicillium verruculosum*, и получению мутантных форм этих целлюлаз с увеличенной каталитической активностью.

В настоящее время целлюлолитические ферменты активно применяются для гидролиза полисахаридов до олиго- и моносахаридов в процессах биотехнологической переработки растительного сырья. Биотехнологическая переработка растительного сырья позволяет получать не только топливо, альтернативное ископаемым энергоносителям (нефть, уголь, природный газ), но и разнообразные химические соединения, традиционно получаемые из нефти в результате химического синтеза (органические спирты и кислоты, углеводы, углеводороды и др.).

Для осуществления эффективной биотехнологической переработки растительного сырья необходимо применение высокоактивных и стабильных ферментных препаратов (ФП). Для получения ФП с требуемыми свойствами применяются различные генно-инженерные подходы, в частности, белковая инженерия сайтов N-гликозилирования. Известно, что N-связанные гликаны на поверхности белковых глобул ферментов могут принимать участие в связывании с субстратом и, таким образом, в проявлении каталитических свойств ферментов. Тем не менее, роль N-гликозилирования в проявлении каталитических и биохимических свойств целлюлаз остается малоизученной.

Таким образом, исследование влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum* позволяет расширить представления о действии целлюлаз, что имеет большое значение как для фундаментальных исследований целлюлолитических ферментов, так и для создания эффективных ФІІ и их практического применения.

**Актуальность исследований Доценко А.С. не вызывает сомнений**, так как представляемая диссертационная работа посвящена решению важной задачи – исследованию влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства целлюлаз и получению мутантных форм целлюлаз с увеличенной каталитической активностью для биотехнологической переработки растительного сырья.

**Научная новизна** диссертационной работы состоит в: 1) определении типа и структуры N-связанных гликанов ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ, экспрессированных в грибах рода *Penicillium* (*P.verruculosum* и *P.canescens*); 2) осуществлении белковой инженерии сайтов N-гликозилирования в рекомбинантных ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum*, экспрессированных в *P.canescens*, определении каталитических и биохимических свойств мутантных форм ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ с измененными сайтами N-гликозилирования (точечными заменами остатков аспарагина в составе сайтов гликозилирования на остатки аланина). В работе показано, что при удалении одного из сайтов N-гликозилирования в структуре целлюлаз такие свойства, как термостабильность и значения температурных и рН- оптимумов каталитической активности, не меняются или меняются незначительно, однако значительно меняется каталитическая активность. В случае ЦБГІ и ЦБГІІ удаление N-связанных гликанов, расположенных у входа в активный центр ферментов, позволяет увеличить их каталитическую активность, а удаление N-связанных гликанов, расположенных вдоль активного центра ферментов (т.е. между молекулой фермента и поверхностью нерастворимого субстрата), – приводит к уменьшению их каталитической активности, что может быть объяснено участием N-связанных гликанов в реализации процессивного механизма гидролиза. В случае ЭГІІ удаление N-связанных гликанов, расположенных как у входа, так и у выхода из активного центра, позволяет увеличить каталитическую активность фермента. Также показано, что изменение степени N-гликозилирования ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum* в результате удаления одного из сайтов N-гликозилирования не оказывает значительного влияния на степень синергизма при действии этих ферментов на такие субстраты, как микрокристаллическая целлюлоза и измельченная древесина осины.

Таким образом, **научная новизна диссертационной работы Доценко А.С. не вызывает сомнений**.



**Практическая значимость** представляемой работы состоит в получении мутантных форм рекомбинантных ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ *P.verruculosum* с увеличенной каталитической активностью и определении компонентного состава смесей ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ, обладающих наибольшей гидролитической способностью по отношению к модельному субстрату (микрористаллическая целлюлоза) и растительному сырью (измельченная древесина осины). Полученные результаты имеют большое значение для разработки нового поколения штаммов на основе грибов рода *Penicillium*, промышленных продуцентов целлюлаз, для применения в процессах биотехнологической переработки растительного сырья на предприятиях, осуществляющих глубокую переработку целлюлозосодержащих материалов. Именно целлюлазы являются основными компонентами ФП, применяющихся в процессах переработки, т.к. целлюлоза является основным компонентом растительного сырья и главным источником гексоз, доступных для микробиологической трансформации. Поэтому задача увеличения каталитической активности целлюлаз является актуальной, а ее решение имеет несомненную **практическую значимость**.

Сформулированные в диссертации выводы подтверждены результатами экспериментальных исследований, проведенными в соответствии с разработанными и опубликованными в научных изданиях методиками. Для обоснования сделанных выводов использованы методы компьютерного моделирования. Моделирование трехмерных структур белковых глобул было осуществлено с использованием программы SWISS-MODEL Швейцарского института биоинформатики, доступной с сервера ExPASy <http://swissmodel.expasy.org/>. Моделирование гликозилированных форм ферментов осуществлялось на базе полученных моделей белковых глобул и структур олигосахаридов с использованием программы Swiss-PdbViewer 4.1.0., доступной с сервера ExPASy <http://www.expasy.org/resources>.

**Структура диссертации** является традиционной. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы и приложение. Библиографический указатель насчитывает 214 источников литературы и включает современные публикации отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 166 страницах, включает 64 рисунка, 21 таблицу и 3 приложения.

Во «Введении» обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи работы, также приведены выводы, научная и практическая значимость полученных результатов.

Сведения, приведенные в разделе «Обзор литературы», соответствуют современному состоянию вопроса. «Обзор литературы» включает в себя описание свойств растительного сырья, принципов его биотехнологической переработки, описание биохимических и каталитических свойств целлюлаз, а также генно-инженерных подходов для улучшения этих свойств. Кроме того, в обзоре рассмотрена роль гликозилирования в проявлении биохимических и каталитических свойств изучаемых ферментов. Материал изложен в строгой логической последовательности и иллюстрирован таблицами и рисунками.

В разделе «Материалы и методы» приведены сведения об использованных в работе материалах и детально описаны методы исследования. Использование в работе современных методов биохимии, биоинформатики, молекулярной биологии и аналитической химии позволяет считать, что полученные результаты являются объективными, достоверными и не вызывающими сомнений.

В разделе «Результаты и их обсуждение» представлены оригинальные экспериментальные результаты и их обсуждение. Схема проведения исследований была общей для трех ферментов (ЦБГІ, ЦБГІІ и ЭГІІ) и включала в себя анализ аминокислотной последовательности, поиск теоретических сайтов N-гликозилирования, получение плазмидной ДНК, несущей гены целлюлаз, трансформацию штамма-реципиента *P.canescens* (лабораторный штамм для гетерологичной экспрессии), выделение и очистку целлюлаз, анализ их свойств. Результаты исследований изложены в порядке ЭГІІ, ЦБГІІ и ЦБГІ, что соответствует принадлежности этих целлюлаз к 5, 6 и 7-й семьям гликозид-гидролаз.

Анализ аминокислотных последовательностей позволил обнаружить в структурах ЭГІІ, ЦБГІІ и ЦБГІ *P.verruculosum* соответственно 3, 4 и 4 теоретических сайта N-гликозилирования: N19, N42 и N194 в ЭГІІ; N219, N265, N279 и N395 в ЦБГІІ; N45, N194, N388 и N430 в ЦБГІ. Компьютерное моделирование трехмерных структур позволило установить, что в случае ЦБГІ и ЦБГІІ все сайты расположены на поверхности белковой глобулы, в случае ЭГІІ два из трех сайтов расположены на поверхности, один – внутри белковой глобулы. Далее с учетом этих данных был осуществлен сайт-направленный мутагенез, получены грибные штаммы, продуцирующие мутантные формы целлюлаз, и выделены гомогенные целлюлазы ЭГІІ, ЦБГІІ и ЦБГІ.

Аминокислотные последовательности мутантных форм целлюлаз были подтверждены масс-спектрометрическим анализом. Также масс-спектрометрическим анализом были определены сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов. В случае ЭГІІ гликозилирование было детектировано для сайтов N42 и N194, N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды общей



структуры  $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$ , где  $x$  составлял 1-9. В случае ЦБГII гликозилирование было детектировано для всех сайтов N219, N265, N279 и N395, N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры  $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$ , где  $x$  составлял 0-15. В случае ЦБГI гликозилирование было детектировано для сайтов N45, N194 и N388, а N-связанные гликаны представляли собой высокоманнозные олигосахариды общей структуры  $(\text{Man})_x(\text{GlcNAc})_2$ , где  $x$  составлял 0-14. Следует отметить, что одна из мутантных форм ЦБГI (ЦБГI N430A) не была выделена и исследована, что определяется отсутствием экспрессии/секреции этой мутантной формы.

Биохимические свойства всех выделенных мутантных форм ЭГII, ЦБГII и ЦБГI были проанализированы в сравнении с немутантными формами. 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 как в случае ЦБГII и ЦБГI, так и в случае ЭГII.

Каталитическая активность мутантных форм исследованных целлюлаз значительно отличалась от активности немутантных форм. В случае ЭГII две из трех осуществленных мутаций оказались положительными: мутация N42A привела к увеличению каталитической активности на 12% по отношению к  $\beta$ -глюкану и на 10% по отношению к карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), мутация N194A привела к увеличению каталитической активности на 35% по отношению к  $\beta$ -глюкану и на 29% по отношению к КМЦ. В случае ЦБГII две из четырех осуществленных мутаций оказались положительными: мутация N219A привела к увеличению каталитической активности на 26% по отношению к микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) и на 29% по отношению к КМЦ, мутация N265A привела к увеличению каталитической активности на 16% по отношению к МКЦ и на 10% по отношению к КМЦ. В случае ЦБГI одна из четырех осуществленных мутаций оказалась положительной: мутация N45A привела к увеличению каталитической активности на 10% по отношению к МКЦ и на 150% по отношению к КМЦ. Сайт N45 в структуре ЦБГI, как и сайты N219 и N265 в структуре ЦБГII, расположен у входа в «туннель» активного центра, сайты N42A и N194A в структуре ЭГII расположены по обе стороны от активного центра. Гликаны, расположенные у входа в активный центр исследованных целлюлаз, могут взаимодействовать с субстратом за счет образования водородных связей и препятствовать попаданию полисахаридной цепи в активный центр, кроме того, гликаны могут влиять на такое свойство целлобиогидролаз, как процессивность.

Использование смесей мутантных форм ЭГП, ЦБГП и ЦБГ, для гидролиза различных целлюлозосодержащих материалов (МКЦ, измельченная древесина осина) позволило на 20-40% увеличить выход глюкозы по сравнению с немутантными формами. Было показано, что при гидролизе МКЦ и измельченной древесины осины наибольшей гидролитической способностью обладали тройные смеси ЦБГ, ЦБГП и ЭГП с компонентным составом 20-60% – 20-60% – 20%, что близко к соотношению этих целлюлаз в ферментном комплексе, секретиромом *P.verruculosum*.

Результаты исследований практически полностью отражены в научных публикациях (10 печатных работ, из которых 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ) и апробированы на международных конференциях и конгрессах. Автореферат полностью соответствует основным результатам исследований, заключениям и выводам, содержащимся в диссертационной работе.

**Вместе с тем при прочтении диссертационной работы Доценко А.С. возникли замечания:**

1. Одна из мутантных форм ЦБГ (ЦБГ N430A) не была получена. Исследования, проведенные по определению внутриклеточной экспрессии, показали отсутствие этой мутантной формы внутри клеток. Информативными в таком случае могут быть исследования по определению уровня синтеза мРНК. Также важно установить уровень внутриклеточной экспрессии для тех мутантных форм, которые были секретированы и выделены. Эти исследования представляют несомненный интерес, их следует провести в дальнейшем.
2. При скрининге грибных трансформантов, секретирующих мутантные формы ЦБГП, в отличие от трансформантов, секретирующих мутантные формы ЦБГ и ЭГП, культивирование было проведено для ограниченного числа трансформантов, содержащих вставку гена *cbhII*, и было выявлено только несколько трансформантов, характеризовавшихся большей активностью по отношению к специфическому субстрату МКЦ по сравнению с штаммом-реципиентом и выбранных для наработки ФП. Было бы правильнее провести скрининг на наличие целевой активности большего числа трансформантов и выявить для каждой мутантной формы несколько трансформантов с увеличенной активностью.

Перечисленные недостатки не снижают научной и практической ценности диссертационной работы, так как не носят принципиального характера.

Диссертационная работа Доценко А.С. представлена обширным экспериментальным материалом и является завершенным научным исследованием. Исследования выполнены



на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов. Сформулированные в диссертации выводы обоснованы и подтверждены результатами экспериментальных исследований в полном объеме.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа **Доценко Анны Сергеевны** является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в решение актуальных задач современной биотехнологии, а именно в исследование влияния N-гликозилирования на каталитические и биохимические свойства целлюлаз и получение мутантных форм целлюлаз с увеличенной каталитической активностью.

Работа была заслушана и обсуждена, отзыв на диссертацию также был обсужден и одобрен на семинаре лаборатории микробной энзимологии ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН» (протокол № 3/16 от «10» октября 2016 года).

Представленная диссертация полностью 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).

Зам. директора ФГБУН «Институт биохимии  
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН»,  
д.б.н., с.н.с

А.А. Леонтьевский

142290, Московская обл., г. Пущино, проспект Науки, д. 5  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина  
Российской академии наук (ИБФМ РАН)  
Тел./факс: +7 (495) 956-33-70; 8 (4967) 73-39-62  
Электронная почта: rta@ibpm.pushchino.ru  
Сайт: www.ibpm.ru

