



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

26.11.14 № 10-217-1-986

на № _____ от _____

«Утверждаю»

Директор ФГБУН «Институт
биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН,
академик РАН,

В.Т. Иванов

« _____ » ноября 2014 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Мордкович Надежды Николаевны «ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНАЭРОБНОГО ДЫХАНИЯ ЭЛЕКТРОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *SHEWANELLA ONEIDENSIS* MR-1 И СТРУКТУРЫ УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ НЕЕ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология.»

Актуальность темы диссертационной работы.

Электрогенная бактерия *Shewanella oneidensis* MR-1 является во всем мире объектом интенсивных исследований. Это связано, прежде всего, с ее уникальной способностью восстанавливать металлы из оксидов, которые она использует в качестве конечных акцепторов электронов при анаэробном дыхании. Такие свойства *S. oneidensis* позволяют применять ее для генерации электричества в микробных топливных элементах, для микробиологической очистки сточных вод, а также в ряде других биотехнологических приложений. В этой связи автором диссертации предпринята успешная попытка усиления анаэробного дыхания бактерии для повышения ее редуцирующей активности путем

экспрессии в бактериальных клетках рекомбинантной NAD^+ -зависимой формиатдегидрогеназы.

Кроме того в своей диссертационной работе Н.Н. Мордкович впервые осуществила детальное исследование свойств и пространственной структуры рекомбинантной высокоочищенной уридинфосфорилазы из того же объекта – *S. oneidensis*. Полученные диссертантом новые фундаментальные результаты должны способствовать более эффективному использованию фермента для химико-ферментативного синтеза противоопухолевых аналогов уридина, а также пониманию механизма лекарственной устойчивости опухолей к этим аналогам с участием уридинфосфорилазы и преодолению такой устойчивости.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 182 страницах компьютерного текста и построена по стандартному плану, то есть состоит из введения, обзора литературы, а также разделов «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение» и «Выводы». Список литературы содержит 243 ссылки, из которых 37 – на русском языке. Диссертация написана хорошим литературным языком, прекрасно оформлена и тщательно выверена.

Теоретическая и практическая значимость

В соответствии с направлением проведенных экспериментальных исследований, в обширном обзоре литературы автором критически и со знанием дела рассмотрены особенности метаболизма и анаэробного дыхания *S. oneidensis*, а также перспективы ее использования в современной биотехнологии. Особое внимание диссертант уделяет первичным акцепторам электронов – периплазматическим редуктазам, локализованным на цитоплазматической мембране, и цитохромам, а также механизмам передачи электронов в дыхательной цепи. Отдельно рассмотрены основные результаты, полученные при использовании *S. oneidensis* MR-1 в микробных топливных элементах. В обзоре литературы Н.Н. Мордкович демонстрирует отличное знание современной отечественной и зарубежной периодики, а также умение работать с ней. Этот раздел диссертации является ее органичной частью и определяет место собственных результатов экспериментальной работы автора в современных исследованиях *S. oneidensis*.

Раздел «Результатов» диссертации можно разделить на две большие части. Первая половина работы посвящена созданию генно-инженерными методами нового штамма *S. oneidensis* MR-1 с повышенной редуцирующей активностью в отношении внешних акцепторов электронов. Предполагалось, что такие рекомбинантные штаммы могли бы обеспечить более высокую плотность электрического тока при культивировании в микробных

топливных элементах. По мнению автора, экспрессия дополнительного гена *fdh* NAD⁺-зависимой формиадегидрогеназы, позволит сдвинуть внутриклеточное равновесие NAD⁺/NADH в сторону восстановленной формы, с окислением формиаата и образованием NADH в цитоплазме. Действительно, Н.Н. Мордкович удалось полноценно экспрессировать ген *fdh* родственной метилотрофной бактерии *Moraxella sp.* в клетках *S. oneidensis* MR-1 и убедиться в существенном ускорении превращения экзогенного фумарата, используемого в качестве акцептора электронов, в сукцинат такими рекомбинантными штаммами. Это косвенно подтверждало повышение внутриклеточного уровня NADH вследствие экспрессии рекомбинантного гена *fdh* и дало возможность исследовать данное явление в микробных топливных элементах. И в этом случае максимальное значение плотности тока в микробном топливном элементе достигалось при культивировании рекомбинантного штамма, экспрессирующего ген *fdh*. В целом, выполнение данной части диссертационной работы подтвердило перспективность развиваемой автором концепции о возможности повышения эффективности микробных топливных элементов путем интенсификации анаэробного дыхания у культивируемых микроорганизмов генно-инженерными методами и указало направление возможных будущих исследований для реализации этого подхода.

Вторая часть диссертационной работы демонстрирует яркие фундаментальные достижения автора в изучении структурно-функциональных особенностей впервые полученной уридинфосфорилазы (UDP) из основного объекта исследования *Shewanella oneidensis* MR-1. В рамках этой части проекта Н.Н. Мордкович проводит большую высококвалифицированную работу по созданию бактериального штамма-продуцента UDP, разработке эффективного метода очистки фермента, его кристаллизации (в том числе и в условиях невесомости на международной космической станции) и исследованию пространственной структуры с помощью рентгено-структурного анализа.. Наличие высокоочищенного препарата UDP позволило автору впервые провести надежный сравнительный анализ первичной и четвертичной структур UDP современными методами, включая масс-спектрометрию MALDI, всесторонне исследовать биохимические свойства фермента, в том числе температурные и pH-оптимумы ферментативной реакции, константы Михаэлиса по уридину и фосфат-иону, потребность в ионах одновалентных металлов.

С учетом данных рентгено-структурного анализа Н.Н. Мордкович удастся создать обоснованную модель, объясняющую стимулирующее действие ионов K⁺ через формирование оптимальной конформации активного центра UDP. Характерные черты модели удалось подтвердить хорошо продуманной заменой аминокислотного остатка цистеина на серин в положении 212 в окрестностях активного центра с последующим изучением свойств мутантного белка по выше обсуждавшемуся алгоритму с привлечением рентгено-

структурного анализа. На основании всей совокупности полученных во второй части диссертации данных автор делает обоснованный вывод о возможности их эффективного использования для рационального конструирования новых молекул UDP, обладающих повышенной эффективностью в химико-ферментативном синтезе противоопухолевых аналогов уридина.

Научная новизна

В результате выполнения диссертационной работы Н.Н. Мордкович впервые получен рекомбинантный штамм *S. oneidensis* MR-1, эффективно экспрессирующий гетерологичную NAD⁺-зависимую формиатдегидрогеназу, что сопровождалось ускоренным анаэробным дыханием и повышенной генерацией плотности тока при культивировании этого штамма в микробном топливном элементе.

Впервые клонирован ген уридинфосфорилазы (UDP) из основного объекта исследования *Shewanella oneidensis* MR-1 и получена его эффективная экспрессия как в гомологичном, так и гетерологичном (*E. coli*) генетическом окружении. Диссертантом разработан новый метод очистки фермента, что позволило всесторонне исследовать его физические и биохимические свойства современными методами. На основании новых данных рентгено-структурного анализа разработана модель функционирования активного центра UDP, что создало условия его рационального изменения методами белковой инженерии для дальнейшей оптимизации функционирования фермента в условиях биотехнологического производства противоопухолевых аналогов уридина.

Замечания к работе

1. Раздел «Материалы и методы» написан излишне кратко. В частности, при описании методов определения активности исследуемых ферментов автор ограничивается приведением ссылок на литературу, что делает необходимым при чтении работы обращаться к оригинальным источникам. Не описана методика определения изоэлектрической точки ферментов.

2. Лиофилизация очищенного препарата фермента перед хранением и дальнейшим использованием может сопровождаться его заметной инактивацией, что, в свою очередь, может оказывать влияние на его свойства после перевода в растворенное состояние перед кристаллизацией и определением кинетических констант. Возможно, лучшим решением было бы изначальное сохранение ферментов в растворе.

3. На диаграммах, описывающих влияние катионов на активность исследуемых ферментов (рисунки 48-51), экспериментальные точки не должны быть соединены кривыми, поскольку между представленными точками не может быть промежуточных значений. Эти

данные необходимо представлять не в виде графиков, а в виде гистограмм.

4. В двух случаях необходимо отметить неверное написание или употребление научных терминов. В частности, в русском языке употребляется термин «промотор», а не «промотер», а термин «синонимическая замена» обозначает мутационную замену нуклеотида, не изменяющую смысл кодона из-за вырожденности генетического кода. Автор же этим термином обозначает аминокислотную замену в белке, сопровождающуюся включением в полипептидную цепь похожего по свойствам аминокислотного остатка.

Все сделанные замечания носят частный характер и не умаляют общей положительной оценки диссертационной работы.

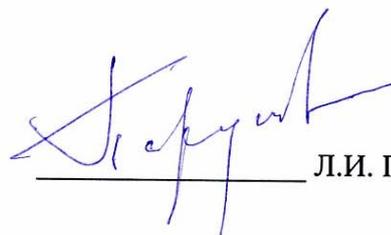
Заключение

Подводя итог всему сказанному, можно заключить, что диссертационная работа Н.Н. Мордкович является оригинальным экспериментальным исследованием на актуальную тему, выполненным на самом современном методическом и теоретическом уровне, имеющим несомненное фундаментальное и прикладное значение. Полученные результаты достаточно полно представлены в сделанных публикациях. Автореферат хорошо отражает содержание диссертации.

Считаю, что диссертационная работа по актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденных постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Н.Н. Мордкович, безусловно заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв заслушан и обсужден на семинаре лаборатории биотехнологии ИБХ РАН 14 ноября 2014 года (протокол №4)

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»
Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва,
ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10
Тел. (495) 335-01-00; e-mail: office@ibch.ru
д.б.н., профессор



Л.И. Патрушев.

Личную подпись Л.И. Патрушева заверяю:
Ученый секретарь ИБХ РАН,
д.ф.-м.н. В.А. Олейников



« ____ » _____ ноября ____ 2014 года