

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации И.С. Каргова
«Структурно-функциональная характеристика
бактериальной и растительной формиадегидрогеназ,
представленный на соискание
ученой степени кандидата химических наук.

Актуальность работы И.С. Каргова как в фундаментальном плане так и для биотехнологии обусловлена изучаемыми объектами – бактериальными и растительными формиадегидрогеназами. С фундаментальной точки зрения важно исследование механизма действия дегидрогеназ - механизма переноса гидрид иона в ферментативном катализе. Ингибиторы фермента могут быть новыми средствами против патогенных бактерий, знание детального механизма действия формиадегидрогеназы нужно для создания эффективных ингибиторов. В биотехнологии фермент используется для регенерации кофермента и для создания биосенсоров на формиа.

В диссертационной работе клонированы два варианта гена *Staphylococcus aureus* формиадегидрогеназы, получены гомогенные препараты двух вариантов фермента и определены их каталитические параметры, показавшие, что ферменты катализируют физиологическую реакцию с величиной k_{cat} , наивысшей среди известных формиадегидрогеназ. Исследована температурная стабильность фермента и комплекса с коферментом и конкурентным ингибитором. Интересно, что и температурная стабильность формиадегидрогеназы из *S. aureus* оказалась выше, чем таковая для большинства формиадегидрогеназ из других источников.

Получение гомогенных препаратов рекомбинантного фермента послужило основой для поиска условий получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа и определения его трехмерной структуры. Эта работа проводилась совместно с НИЦ «Курчатовский институт». Структуры апофермента и тройного комплекса с коферментом и ингибитором были определены с разрешениями 1.8 Å и 2.5 Å.

Далее анализ этих пространственных структур, структур, известных для других формиадегидрогеназ, анализ выравнивания аминокислотных последовательностей фермента из различных источников позволил выявить вариации аминокислотных остатков в трех фрагментах полипептидных цепей, могущие приводить к различию каталитических параметров и температурной стабильности фермента, присутствующего в бактериях и растениях.

Для формиадегидрогеназы из *S. aureus* и из сои методом сайт-направленного мутагенеза были созданы и экспрессированы в клетках *E. coli* десять мутантных форм, получены гомогенные препараты. Для них были определены каталитические параметры и температурная стабильность. Полученные данные позволили выявить роль отдельных остатков, находящихся в консервативных аминокислотных фрагментах формиадегидрогеназы из *S. aureus* и из сои. Интересным фактом (для последующего улучшения свойств фермента при использовании его в биотехнологии) является повышенная по сравнению с ферментом дикого типа температурная стабильность всех исследованных форм формиадегидрогеназы из сои. Для фермента из *S. aureus* показано, что

«нехарактерный» остаток фенилаланина 196, присутствующий в консервативном мотиве форматдегидрогеназ «GXGXXG», участвует в связывании NAD^+ , а остаток валина 323 необходим для обеспечения температурной стабильности фермента.

Объем экспериментальной работы И.С. Каргова большой, заявленные шесть целей полностью выполнены. При ее выполнении использовались разнообразные современные методы физико-химической биологии - методы белковой химии, энзимологии, молекулярной биологии, информатики, рентгеноструктурного анализа. Это демонстрирует высокие теоретический и экспериментальный уровни соискателя. Достоверность полученных данных несомненна. Автореферат написан грамотным языком, содержит незначительное количество опечаток и хорошо оформлен.

Ниже приводятся некоторые замечания, которые не снижают высокую в целом оценку диссертационной работы И.С. Каргова.

- 1) По моему мнению, вместо малоинформативного Рис. 2 (стр. 8) следовало привести таблицу очистки фермента.
- 2) Результаты исследования температурной стабильности фермента не приведены в разделе «Выводы», хотя полученные в результате значительного объема работы интересные данные нужно было поместить в этом разделе.
- 3) При приведении для пространственных структур параметра «Разрешение» лучше указывать цифры до второго знака после запятой.

Диссертация И.С. Каргова заслуживает высокой оценки, автореферат удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к авторефератам диссертаций, представляемых на соискание ученой степени кандидата наук, и автор, конечно, заслуживает присуждения ему степени кандидата химических наук.

Главный научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

д.х.н., профессор



(Т.В. Демидкина)

