

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Ивана Сергеевича КАРГОВА «Структурно-функциональная характеристика бактериальной и растительной формиатдегидрогеназ», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертация Каргова И.С. посвящена получению, изучению свойств и структурно-функциональному исследованию формиатдегидрогеназ из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и из сои *Glycine max*. Формиатдегидрогеназа играет важную физиологическую роль в патогенных микроорганизмах (в том числе *S.aureus*) нового типа антибактериальных препаратов против биопленок *S.aureus* на основе ингибиторов формиатдегидрогеназы. Отметим, что в настоящее время для борьбы с биопленками стафилокков в клиниках и больницах используются обычные щелочноокислительные химические агенты и только в США на это тратиться более 2 миллиардов долларов. Исследование формиатдегидрогеназ также важно с точки зрения фундаментальной науки, поскольку на примере данного фермента изучается механизм переноса гидрид-иона в активном центре дегидрогеназ для очень большого суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот. Формиатдегидрогеназа также используется на практике в процессах тонкого и хирального органического синтеза с помощью NAD(P)+-специфичных оксидоредуктаз.

В ходе выполнения работы было решен ряд задач фундаментального и практического характера. Автором были клонированы два варианта гена, кодирующего формиатдегидрогеназу из бактерий *S. aureus* (SauFDH), разработана эффективная система экспрессии рекомбинантного фермента, позволяющая получить до 1 грамма белка с литра среды. Была также разработана эффективная система очистки фермента, позволяющая получить гомогенный препарат фермента, и исследованы катализитические параметры новой формиатдегидрогеназы. Несомненным достижением работы оказался тот факт, что SauFDH обладает самой высокой (в 3-10 раз) каталитической константой среди описанных в литературе формиатдегидрогеназ. Исследование температурной стабильности рекомбинантного фермента показано, что по этому параметру SauFDH превосходит (за исключением ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp.101) все описанные формиатдегидрогеназы дикого типа. Разработанная система получения и очистки формиатдегидрогеназы *S. aureus* позволила получить количество гомогенного препарата фермента, необходимое для проведения кристаллизации и последующего решения трехмерной структуры фермента с помощью рентгеноструктурного анализа. Для апо- и холоформ SauFDH были определены структуры с разрешением 1,8 и 2,5 Å, соответственно.

С помощью анализа полученной экспериментальной структуры SauFDH, сравнения ее со структурой формиатдегидрогеназы из сои *Glycine max* (SoyFDH), а также результатов выравнивания аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из разных источников, был обнаружен ряд аминокислотных остатков в консервативных мотивах, с большой вероятностью ответственных за столь большую удельную активность и температурную стабильность фермента.

С помощью метода направленного мутагенеза для двух формиатдегидрогеназ (SauFDH и SoyFDH) было получено десять мутантных форм, экспрессированных в *E. coli* и очищенных до состояния гомогенного препарата. Для всех полученных мутантных ферментов были определены каталитические параметры и температурная стабильность. Показано, что для ряда мутантных форм SoyFDH были улучшены как каталитические параметры, так и термостабильность. Также объясняется роль некоторых аминокислотных остатков в механизме действия SauFDH: остаток Phe196 в активном центре отвечает за связывание молекулы кофермента, а остаток Val323 обеспечивает выдающуюся температурную стабильность данного фермента.

Кандидатская биссертация Каргова И.С. является законченным квалификационным исследованием. Автореферат дает полное представление о диссертационной работе, которая заслуживает самой высокой оценки. Результаты были опубликованы в ведущих международных и российских журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий ВАК РФ, а также должны на большом количестве международных конференций и симпозиумов. Полученные результаты имеют важное теоретическое и практическое значение. Жиссертационная работа Каргова И.С. полностью удовлетворяет требованиям Положения Правительства РФ о порядке присуждения степеней доктора и кандидата наук, а ее автор И.С. Каргов безусловно заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 Биохимия и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

зав. кафедрой химии природных соединений
химического факультета
ФГБОУ ВО "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова"
академик РАН, доктор химических наук,

Донцова Ольга Анатольевна

Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

Адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 3.
Тел. 8 (495) 932-88-24, E-mail: dontsova@belozersky.msu.ru.

14 декабря 2017 г.

Подпись О.А. Донцовой заверяю

