

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Каргова Ивана Сергеевича «Структурно-функциональная характеристика бактериальной и растительной формиаатдегидрогеназ», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Формиаатдегидрогеназа является объектом научных исследований на протяжении более 50 лет и представляет большой интерес, как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения практического применения. Формиаатдегидрогеназы широко используются в качестве универсального биокатализатора регенерации NADH, поскольку продукт реакции, катализируемой формиаатдегидрогеназой – восстановленный кофермент NADH – является субстратом для многих дегидрогеназ, которые применяются в биотехнологических процессах синтеза оптически активных соединений. Необходимо также отметить важную физиологическую роль формиаатдегидрогеназ. Гены этого фермента найдены в геномах большинства патогенных микроорганизмов. При росте патогенов в виде биопленок формиаатдегидрогеназа отвечает за энергоснабжение клетки. Поэтому в связи с широким распространением резистентности к современным антибактериальным препаратам поиск селективных ингибиторов формиаатдегидрогеназ патогенов может стать новым направлением разработки антисептических препаратов.

Диссертационная работа И.С. Каргова посвящена клонированию гена формиаатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*, изучению свойств двух вариантов рекомбинантного фермента, получению экспериментальной структуры данного фермента и детальному исследованию свойств новой формиаатдегидрогеназы. Второй частью работы является изучению методом направленного мутагенеза исследование взаимосвязи структура-функция двух формиаатдегидрогеназ из бактерий *S. aureus* и сои *Glycine max*. Работа построена по классической схеме, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы.

В обзоре литературы подробно рассматриваются данные о структурных характеристиках формиаатдегидрогеназ из различных источников, их различные биохимические свойства, способы стабилизации методами белковой инженерии, а

также подробно рассмотрены примеры использования форматдегидрогеназ на практике. Анализ обзора литературы свидетельствует, что автор в полной мере владеет информацией в данной области, а направление и тема диссертационной работы являются полностью обоснованными.

Раздел Материалы и методы исследования содержит подробное описание использованных в работе методов, детально описаны все проведенные эксперименты. Анализ этой части диссертационной работы показывает, что она выполнена на высоком экспериментальном уровне с использованием разнообразных самых современных физико-химических, биоинформационных, биохимических и других методов исследования. Надежность и достоверных полученных данных не вызывает сомнений.

В разделе «Результаты и их обсуждение» представлены результаты собственных исследований автора и их обсуждение. В нем подробно описано клонирование двух вариантов гена форматдегидрогеназы из бактерий *S. aureus*, оптимизация экспрессии и систем выделения и очистки, изучения основных свойств фермента. Следует отметить, что оптимизация экспрессии позволила получить более 1 грамма с литра среды длинного варианта фермента, что является очень высоким показателем. Несомненным и важным достижением этого раздела также является то, что каталитическая константа нового фермента более чем в три раза превосходит таковую для всех ранее описанных форматдегидрогеназ. При улучшении значений констант Михаэлиса ФДГ из *S. aureus* может найти применение для регенерации восстановленного NADH в процессах тонкого органического синтеза. Также были проведены эксперименты по кристаллизации и определена трехмерная структуры фермента дикого типа с ее последующим анализом для направленного изучения взаимосвязи структуры и функции этого фермента. Подобные эксперименты по направленному мутагенезу в структурно эквивалентном положении проводили и в формиадегидрогеназе из сои *G. max*. Было получено более десяти мутантных ферментов и изучено влияния вводимых аминокислотных замен на каталитические свойства и стабильность. Было показано, что замена остатка фенилаланина на поверхности кофермент-связывающего домена активного центра ФДГ из сои *Glycine max* приводит как к увеличению каталитической константы (до 75%), так и термостабильности (до 50 раз).

По материалу, представленному в диссертации, имеются следующие замечания:

1. Исходя из информации, представленной в диссертации, новая формиатдегидрогеназа из бактерий *S. aureus* (SauFDH) проявляет нехарактерно низкий процент гомологии с другими ферментами из данного семейства. Достаточно ли такого низкого показателя для того, чтобы отнести данный фермент непосредственно к семейству формиатдегидрогеназ?

2. Согласно экспериментальным данным по зависимости термостабильности от концентрации фосфат-ионов в растворе, формиатдегидрогеназа из бактерий *S. aureus* (SauFDH) проявляет наименьшую стабильность при концентрации фосфатного буфера, равной 0,1 М. Однако такая концентрация буфера использовалась при очистке. Насколько целесообразно использование именно этой концентрации в протоколе очистки фермента?

Диссертация логично построена, написана ясным и понятным научным языком. Литературный обзор и экспериментальная часть диссертации полностью соответствуют научному содержанию работы, прекрасно дополняя и объясняя ее. Высокий экспериментальный уровень, тщательное планирование экспериментов свидетельствуют о высокой надежности и достоверности полученных данных. Выводы, сделанные автором, обоснованы и соответствуют основному содержанию работы. По теме диссертационной работы опубликованы три статьи в рецензируемых российских и иностранных журналах, входящих в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, а также сделаны доклады на международных и всероссийских конференциях. Содержание автореферата полностью соответствует материалам диссертации. Диссертационная работа является законченным научным исследованием и выполнена на высоком научном и методическом уровне. Сделанные замечания не ставят под сомнение достоверность полученных результатов и адекватность сделанных выводов. Работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ согласно пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции № 335 от 21 апреля 2016 г.), а ее соискатель Каргов Иван Сергеевич заслуживает

присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальностям
03.01.04 – биохимия, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Тевяшова

Тевяшова А.Н.

д.х.н., в.н.с. лаборатории химической трансформации
антибиотиков ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Подпись д.х.н. А.Н. Тевяшовой заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ НИИНА,
кандидат химических наук

Кисиль

О.В. Кисиль

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени
Г.Ф. Гаузе»

119021, Российская Федерация, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11,
строение 1 Тел. +7(499)246-0636

Электронный адрес официального оппонента: chulis@mail.ru

29.11.17

Дата