ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

Исх. № 12312-9311/1
«28» 11 2017 г.

У Т В Е Р Ж Д А Ю
Зам. директора Института
молекулярной биологии
им.В.А.Энгельгардта РАН,
член-корреспондент РАН
В.Л.Карпов
«28» 11 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Фермент формиатдегидрогеназа известен уже около 70 лет, однако до сих пор привлекает пристальное внимание исследователей. Данный фермент катализирует реакцию окисления ионов формиата до углекислого газа, восстанавливая при этом кофермент NAD^+ до NADH. Благодаря этому факту он находит широкое применение на практике, поскольку NADH в свою очередь является коферментом для многих дегидрогеназ, активно использующихся в тонком органическом и хиральном синтезе. Например, промышленный процесс получения *терт*-L-лейцина, в котором формиатдегидрогеназа используется для регенерации восстановленного кофермента, был реализован фирмой Degussa (в настоящее время Evonik) в 1999 году и в настоящее время

является самым крупным процессом хирального синтеза с использованием очищенных ферментов. Другим актуальным аспектом в изучении формиатдегидрогеназы является ее важная физиологическая роль. Известно, что у патогенных микроорганизмов и растений она является ферментом стресса, т.е. ее содержание резко возрастает в неблагоприятных условиях, а сама она становится основным поставщиком энергии. Изучение свойств формиатдегидрогеназы крайне интересно для разработки новых препаратов против биопленок стафилококков на основе ингибиторов формиатдегидрогеназы. Третьим, важным с точки зрения фундаментальной науки, является исследование взаимосвязи структура-функция в формиатдегидрогеназе как модельного фермента для очень большого суперсемейства дегидрогеназ D-оксикислот. В механизме катализируемой формиатдегидрогеназой реакции отсутствуют стадии кислотно-основного катализа, что значительно упрощает изучение механизма переноса гидрид-иона в активном центре фермента. Эти данные также могут быть использованы для получения формиатде гидргеназ с улучшенными свойствами, например повышенной каталитической активностью.

Диссертационная работа Каргова И.С. посвящена клонированию и экспрессии двух вариантов новой формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*, Этот фермент в *S. aureus* играет исключительно важную роль при их функционировании в виде биопленок. Он также крайне интересен с точки зрения изучения общего механизма действия формиатдегидрогеназы, поскольку его гомология с ферментами из других источников составляет всего 30%., что является очень низким показателям для формиатдегидрогеназ. Было установлено, что формиадегидрогеназа из стафилоккоков обладается самой высокой каталитической константой (минимум в три раза выше) по сравнению со всеми описанными формиатдегидрогеназами. Исследование методом направленного мутагенеза взаимосвязи структура-функция двух формиатдегидрогеназ из бактерий *S. aureus (*SauFDH) и из сои *Glycine max* (SoyFDH) позволило выяснить роль отдельных остатков и получить перпараты фермента с улучшенными свойствами.

Диссертационная работа построена по классической схеме. Она состоит из следующих разделов: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и их обсуждения, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 140 страницах и содержит 45 рисунков, 19 таблиц и 169 ссылок.

Обзор литературы состоит из четырех основных частей. Первая часть посвящена детальному анализу структуры различных формиатдегидрогеназ и сравнения их с

основным объектом исследования SauFDH. Во второй части содержится подробная информация о свойствах (кинетические и каталитические параметры, температурная стабильность, константы ингибирования) известных формиатдегидрогеназ. В третьей части детально рассмотрены различные методы мутагенеза, применяемые для изучения свойств ферментов и приведены различные примеры экспериментов, в том числе и с формиатдегидрогеназами. Отдельный раздел обзора посвящен данным, связанным с современным практическим применением ФДГ. Обзор литературы хорошо структурирован и дает подробное представление о текущем состоянии проблемы, из которого логично следуют цели и задачи данного исследования.

В разделе Материалы и Методы описаны объекты и материалы, используемые в исследовании, и дано подробное описание разнообразных и современных методов, использованных в работе. Этот раздел свидетельствует о большом объеме проведенных исследований и высокой квалификации автора в области современной молекулярной биологии и биохимии.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из восьми частей.

В первой части Результатов описано причины существования двух вариантов аннотации гена формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*, последующее клонирование двух вариантов гена и создание штаммов-продуцентов ферментов.

Во второй части Результатов описана разработка методики культивирования штаммов-продуцентов. Оптимизированы условия культивирования рекомбинантной SauFDH, что позволило получать до 1000 мг активного фермента с литра среды, а также изучено влияние таких факторов, как температура и выбор индуктора, на конечный выход фермента.

В третьей части описана разработка методики выделения и очистки рекомбинантной SauFDH с использованием температурной обработки и ионно-обменной хроматографии, позволяющая получать препараты различной степени чистоты с высоким выходом по активности.

Четвертая часть посвящена исследованию основных свойств рекомбинантной SauFDH и сравнению полученных результатов с литературными данными. Изучены кинетические параметры SauFDH, зависимость констант Михаэлиса от значения pH, а также влияние температуры на активность фермента. Показано, что фермент обладает чрезвычайно высокими значениями констант Михаэлиса как по субстрату, так и по

ферменту, в то же время обладает максимальной каталитической константой среди всех описанных формиатдегидрогеназ.

Пятая часть Результатов и их обсуждения посвящена исследованию стабильности фермента при высоких температурах на основе кинетики термоинактивации. Был установлен механизм инактивации рекомбинантного фермента дикого типа, определены активационные параметры процесса термоинактивации с помощью теории активированного комплекса. Также было изучено влияние ионной силы и значения pH на температурную стабильность фермента. Помимо этого изучение термостабильности апо- и холо-форм SauFDH было проведено методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Шестая часть Результатов посвящена кристаллизации апо- и холо-форм рекомбинантной SauFDH, а также решению структуры полученных кристаллов. Получена экспериментальная структура, которая создает основу для проведения экспериментов по белковой инженерии фермента.

Седьмая и восьмая части Результатов посвящены белковой инженерии SauFDH и SoyFDH и изучению свойств полученных мутантов. Было исследовано влияние структуры консервативного мотива GXGXXG на свойства и функции SauFDH и показано, что введение аминокислотной замены в вариабельную позицию мотива приводит к значительному увеличению константы Михаэлиса по коферменту, что объясняется изменением структуры активного центра вследствие введения мутации. Также показано, что введение аминокислотной замены по принципу ужесточения полипептидной цепи приводит к критической дестабилизации фермента, вследствие чего температурная стабильность ухудшается более, чем в 5 раз. Кроме этого, в работе показано, что введение сходных аминокислотных замен в соответствующее положение приводит к разным результатам в случае SauFDH и SoyFDH. Замена поверхностного гидрофобного остатка фенилаланина на менее объемные и заряженные аминокислотные остатки в случае SoyFDH приводит к увеличению температурной стабильности и к улучшению всех каталитических параметров, в то время как замена остатка тирозина в случае SauFDH приводит к ухудшению как термостабильности, так и констант Михаэлиса и каталитической константы. Такое различие во влиянии сходных замен на функции ферментов объясняется большим различием в структурах SauFDH и SoyFDH. Особо следует отметить, что направленный мутаиенез остатка Phe290 в SoyFDH позволил не

только улучшить термостабильность более, чем в 50 раз, но и повысить каталитическую константу практически без изменения констант Михаэлиса.

Работа хорошо оформлена и написана грамотным научным языком, выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях с использованием современных методов исследования (белковая инженерия, биоинформатический анализ, компьютерное моделирование и др.). Результаты диссертации обладают большой научной новизной и практической значимостью. Выводы диссертации хорошо обоснованы и непосредственно следуют из представленных экспериментальных данных. Данная работа вносит существенный вклад в исследование взаимосвязи структуры и функции всего семейства формиатдегидрогеназ. Использование метода рационального дизайна позволило получить препараты ФДГ с улучшенными свойствами, которые могут найти применение на практике.

К работе имеются следующие замечания и вопросы:

1. Автор для выяснения, какая форма является природной, клонировал два аннотированных варианта гена формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus*. Подобная задача могла бы также быть решена с помощью транскриптомного анализа.

2. Поскольку ионная сила может влиять на стабильность и активность фермента, насколько корректно измерение активности исследуемой ФДГ в процессе очистки в присутствии сульфата аммония?

Сделанные замечания являются несущественными и никоим образом не влияют на достоверность и надежность полученных результатов, а также на выводы диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы докладывались на международных и всероссийских научных симпозиумах и конференциях, опубликованы в ведущих российских и международных журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Полученные автором результаты могут быть использованы в лабораториях, работающих в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии - в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институте физико-химической биологии

им. А.Н. Белозерского МГУ, на Химическом и Биологическом факультетах и Факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, в ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов».

Диссертационная работа Каргова И.С. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым ВАК согласно пункту 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 автор безусловно заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН 23 ноября 2017 г.

Отзыв составил заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор Кочетков С.Н.

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН).
Лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений,
тел. +7 (499) 135-05-90,
e-mail: kochet@eimb.ru