

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора химических наук, заведующего лабораторией молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН **Мирошникова Константина Анатольевича**

на диссертацию **Каргова Ивана Сергеевича**
«Структурно-функциональная характеристика бактериальной и растительной формиатдегидрогеназ»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа И.С. Каргова, представленная на защиту, посвящена комплексному изучению NAD^+ -зависимых формиатдегидрогеназ (ФДГ) *Staphylococcus aureus* и сои, взаимосвязи структуры ферментов и их функций, а также выявлению роли отдельных аминокислотных остатков в полипептидных цепях ФДГ в функционировании каталитического центра и стабилизации белков.

Формиатдегидрогеназы – класс ферментов, широко востребованных в биотехнологическом производстве в качестве катализаторов. Поэтому как поиск новых ФДГ и разработка методов биосинтеза и очистки их рекомбинантных вариантов, так и стратегия рационального направленного мутагенеза для получения ФДГ с повышенной активностью, стабильностью или наилучшей приспособленностью к заданным условиям проведения синтеза относятся к актуальным проблемам и фундаментальной белковой химии, и биотехнологии. Таким образом, представленную диссертационную работу можно отнести к перспективным направлениям научного и технологического поиска. Проведенное исследование имеет очевидную научную новизну, фундаментальную и практическую значимость.

Исследование имеет обоснованный экспериментальный план, разделенный на логичные этапы, необходимые для достижения конечного результата. В работе были использованы разнообразные современные научные методы – биоинформационный поиск, молекулярное клонирование, белковая инженерия, спектрофотометрическое определение энзимологических параметров, сканирующая калориметрия, рентгеновская кристаллография белка, молекулярно-динамическое моделирование. Совокупность полученных экспериментальных результатов позволяет оценить работу И.С. Каргова как законченный научный труд с обоснованными выводами.

Диссертация И.С. Каргова построена по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список использованных литературных источников (169 ссылок). Материал диссертации изложен на 140 листах текста и иллюстрирован 19 таблицами и 45 рисунками.

В разделах «Введение» и «Обзор литературы» автор даёт обоснование цели исследований, определяет задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы представлены общие сведения о ФДГ, механизме катализа, структуре, стабильности, физиологической роли у бактерий и растений, известных и потенциальных приложениях ФДГ в биотехнологии. В контексте практического использования в обзоре рассмотрены методы улучшения параметров активности и стабильности фермента физическими, химическими и генно-инженерными методами. Отдельной главой дается биоинформатическое сравнение первичных последовательностей ФДГ из различных источников, на основании чего делается вывод об эволюционной обособленности ФДГ стафилококков и описываются отличающиеся аминокислотные остатки, роль которых в ходе работы планируется уточнять. Эта глава представляет собой сделанное автором аналитическое исследование и имеет самостоятельную

ценность. Однако следует отметить, что для более корректного тезиса об эволюционном формировании отдельной группы стафилококковых ФДГ следовало бы в последовательности сравнения включать не только ФДГ высших растений, грибов, актиномицетов и грамотрицательных бактерий, но и других семейств бактерий, относящихся к грамположительным Firmicutes – например, *Listeria*, *Bacillus* и *Enterococcus*. В целом, обзор литературы отличается хорошей структурированностью, наглядно иллюстрирован, и дает читателю достаточную информацию для оценки предпосылок проведения диссертационного исследования и мирового экспериментального задела в этой области.

Описание проведенных диссертантом исследований приведено в разделе «Материалы и методы». Используемые методы микробиологии, молекулярной биологии, белковой химии, энзимологии, структурной биологии приведены с детальностью, достаточной для независимого воспроизведения, причем некоторые методы, давно рутинные (приготовление хемокомпетентных бактериальных клеток, ПЦР, электрофорез в полиакриламидном геле) даны излишне подробно. Обсуждение результатов исследований представлено в соответствующем разделе. Каждый блок полученных результатов обоснован, наглядно представлен, анализ новых данных проведен в свете ранее известного материала. Обращает на себя внимание большое количество и наглядность иллюстраций. Следует отметить рациональный и остроумный протокол получения рекомбинантного целевого белка и его очистки с использованием классических методов, дающий очень высокий выход и не требующий сложной хроматографической аппаратуры. Таким образом, эта методика легко масштабируема и адаптируема к условиям реального биотехнологического производства. Основные результаты, полученные И.С. Карговым – определение более активной изоформы целевой стафилококковой ФДГ, получение кристаллов и рентгеновской структуры белка с высоким

разрешением, глубокий анализ пространственной модели белковой глобулы, подтверждение роли конкретных аминокислотных остатков в полипептидной цепи и сравнение полученных мутантов с аналогичными мутантами ФДГ иного (дрожжевого и растительного) происхождения – полностью обоснованы и достоверны.

Пять выводов работы полностью соответствуют поставленным в начале работы задачам, точно отражают содержание работы, и позволяют считать основную цель работы достигнутой. Научные положения, выносимые на защиту, в полной степени отражены в результатах работы и соответствуют паспортам заявленных специальностей 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнологии (в том числе бионанотехнологии).

По теме диссертации автором опубликованы 9 статей (в соавторстве) в рецензируемых международных журналах, индексируемых в Web of Science (Protein Science, PEDS, FEBS Journal, Acta Naturae). Апробация работы проведена в виде 42 устных и стендовых сообщений на международных и российских научных конференциях. По результатам исследования оформлено 2 патентные заявки на улучшенные мутанты ФДГ, что подтверждает практическую значимость проведенной работы. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы И.С. Каргова «Структурно-функциональная характеристика бактериальной и растительной формиятдегидрогеназ» полностью отражают содержание диссертации.

В целом, диссертационная работа Ивана Сергеевича Каргова отличается научной новизной, логичной схемой проведенных исследований, качественными иллюстрациями, поясняющими результаты экспериментов.

По результатам изучения текста диссертации имеется ряд вопросов и замечаний.

1. Насколько вообще корректно противопоставлять стафилококковые ФДГ другим бактериальным (с.20)? Это делается на сравнении последовательностей ферментов из очень эволюционно отдаленных организмов (Табл.2.1). Среди микробов в качестве объектов сравнения берутся ФДГ грамотрицательных бактерий и актиномицетов. При этом нет описанного выравнивания с другими грамположительными фирмикутами вроде бациллюсов, листерий и энтерококков. Геномов этих бактерий в NCBI много, Если SauFDG отличается и от них, это был бы еще более сильный тезис, а если нет, то нужно быть поаккуратней с глобальностью обобщений.

2. Некоторые методы, приведенные в разделе «Материалы и методы» описаны излишне подробно. Тем не менее, в некоторых методиках присутствуют опечатки.

Высказанные замечания, однако, не носят принципиального характера и не влияют на основные результаты и выводы работы.

Заключение

Диссертационное исследование **Каргова Ивана Сергеевича** «Структурно-функциональная характеристика бактериальной и растительной формиаатдегидрогеназ», выполненное под руководством д.х.н., профессора Тишкова Владимира Ивановича и к.х.н. Пометун Анастасии Александровны, является законченной научно-квалификационной работой.

По актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований, настоящая работа полностью соответствует требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлением Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года №335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), а ее автор, Каргов Иван Сергеевич, достоин присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнологии (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент,
Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» (ИБХ РАН)

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
тел. +7(495)335-55-88, e-mail: kmi@ibch.ru

доктор химических наук,
Константин Анатольевич Мирошников



Подпись К.А. Мирошникова заверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН,

д.ф.-м.н.

Владимир Александрович Олейников

