

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Пометун Анастасии Александровны «Структурно-функциональные взаимосвязи и белковая инженерия форматдегидрогеназ», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Диссертационная работа Пометун Анастасии Александровны посвящена исследованию структуры новых ферментов форматдегидрогеназ (ФДГ) из различных источников: бактерий, дрожжей, растений, а также нахождению общих закономерностей между их структурой и свойствами.

1. Актуальность темы диссертации

NAD(P)⁺-зависимые форматдегидрогеназы (КФ 1.2.1.2.) образуют довольно большую группу белков, к которой проявляется большой интерес, как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения практического применения. Известно, что основная физиологическая роль форматдегидрогеназ – это снабжение клетки энергией, а на практике этот фермент широко применяется для регенерации восстановленного кофактора в различных биотехнологических процессах (в первую очередь хирального синтеза) с участием оксидоредуктаз. Поэтому получение новых форматдегидрогеназ, изучение их свойств, а также их инженерия с целью получения ферментов, обладающих улучшенными или новыми свойствами, является актуальной задачей на настоящий момент.

2. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

На основании проведенной работы автором сформулировано 9 выводов. Все выводы диссертационной работы Пометун А.А. основаны на большом экспериментальном материале, полностью отражают результаты работы и соответствуют поставленным в диссертации задачам. Для достижения цели и решения задач диссертант использовал широкий круг современных экспериментальных подходов и методов. Это, прежде всего, методы биохимии - хроматография, спектрофотометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия, а также биоинформатика - поиск генов по базам

данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, генная инженерия и молекулярная биология, методы структурной биологии, рациональный дизайн белков, методы молекулярного моделирования. Такое широкое разнообразие методов обеспечило получение надежных результатов.

Используемые в данной работе методы изучения свойств ферментов соответствуют в полной мере современному мировому уровню исследований в данной области науки. Они характеризуются высокой надежностью и воспроизводимостью, что обеспечивает достоверность каждого результата работы. При этом достоверность выводов диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной. Из наиболее значимых результатов данной работы следует отметить получение новых рекомбинантных формиатдегидрогеназ с выдающимися свойствами – самой высокой каталитической константой и температурной стабильностью, а также самой высокой каталитической эффективностью среди известных в настоящее время. Кроме того, автором были получены пространственные структуры новых ФДГ в свободной форме и в комплексе с субстратами, которые позволили провести анализ взаимосвязи между структурой и свойствами и обоснованно выбрать положения для введения аминокислотных замен. В результате применения различных подходов были получены ферменты с увеличенной температурной и операционной стабильностью. Особо следует отметить работы по изменению коферментной специфичности ФДГ с NAD^+ к NADP^+ .

3. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

Научная ценность результатов диссертационной работы связана со структурно-функциональными исследованиями новых ФДГ из различных источников - патогенных бактерий *S. aureus* (SauFDH), термотолерантных дрожжей *O. parapolymorpha* (OpaFDH), а также растений сои *G. Max* (SoyFDH) и мха *P. patens* (PpaFDH). Оказалось, что природные формы ферментов из новых источников обладали уникальными свойствами: самой высокой каталитической константой (SoyFDH) или самыми низки-

ми значениями констант Михаэлиса как по NAD^+ , так и по формиату (SoyFDH и OraFDH) среди всех изученных на настоящий момент формитатдегидрогеназ.

Детальный анализ структур новых ФДГ позволил диссертанту разработать стратегию рационального дизайна ферментов и успешно её реализовать в получении мутантных форм ферментов за счет точечных аминокислотных замен. Так, термостабильность лучшей мутантной формы SoyFDH при повышенных температурах возросла на два порядка, а каталитическая активность – на 7-76%. За счет точечных аминокислотных замен получены две мутантные формы PpaFDH, обладающие более высокой стабильностью в 9 и 90 раз соответственно. В результате работ по рациональному дизайну удалось получить варианты ферментов, которые могут успешно применяться на практике в качестве биокатализатора для регенерации кофактора в биокаталитических процессах, требующих его участия.

4. Содержание диссертации

Диссертация А.А. Пометун имеет традиционный план изложения. Она состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание экспериментальной части, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список использованных литературных источников (381 ссылка). Материал диссертации изложен на 309 страницах и содержит 46 таблиц и 91 рисунок.

В разделе «Введение» автором обоснована актуальность темы исследования, обозначены цели и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

В разделе «Обзор литературы» представлены общие сведения о NAD(P)^+ -зависимых формиатдегидрогеназах, ретроспективе их исследований, дана подробная информация о физиологической роли этих ферментов в различных организмах. В этом разделе содержится подробная информация о ранее клонированных генах, кодирующих ФДГ, экспрессии, очистке, а также свойствах рекомбинантных ферментов. Автором проведен подробный анализ множественного выравнивания аминокислотных последовательностей и пространственных структур ФДГ из

различных источников. Также представлены данные о методах и подходах белковой инженерии, использованных различными исследователями для улучшения свойств формиатдегидрогеназ из различных источников. В отдельной главе Обзора литературы представлена информация о практическом применении формиатдегидрогеназ. Помимо основной области применения этого фермента – регенерация кофактора в процессах тонкого и хирального органического синтеза, автором приведена информация о других направлениях применения, которые являются интересными и перспективными. В целом, хочу отметить, что Обзор литературы хорошо структурирован и дает полную информацию об объектах исследования – NAD(P)^+ -зависимых формиатдегидрогеназах, а также состоянии исследований в этой области на настоящий момент. Из приведенного обзора литературы хорошо видно дальнейшее направление исследований в этой области, что и было выполнено диссертантом в настоящей работе.

В разделе «Материалы и методы исследований» автор привел подробное описание методик, которые могут быть легко воспроизведены другими исследователями. Описание методов приводится понятным языком, с указанием всех необходимых условий.

Раздел «Результаты и их обсуждение» представлен двумя большими частями: первая включает в себя получение и изучению свойств и структуры формиатдегидрогеназ дикого типа, а вторая посвящена белковой инженерии ФДГ. Основными результатами первой части являются получение новых формиатдегидрогеназ с уникальными свойствами – самым высоким значением каталитической константы по сравнению с другими ферментами этого типа, а также высокой термостабильностью. Все результаты хорошо иллюстрированы таблицами и графиками. В результате проделанной работы удалось получить новые пространственные структуры ферментов, что является значительным результатом. Полученные структуры позволили автору провести исследование взаимосвязи между структурой и свойствами формиатдегидрогеназ, а также предложить перспективные положения для направленного мутагенеза. Во второй большой части «Результатов и их обсуждения» представлены данные по получению и физико-химической

характеристике мутантных форм формиатдегидрогеназы. Автору удалось добиться серьезных результатов: получению мутантной формы ФДГ с увеличением стабильности на два порядка за счет точечной аминокислотной замены. Также удалось изменить коферментную специфичность ФДГ с NAD^+ на NADP^+ . Результаты представлены последовательно, выводы обоснованны и не вызывают сомнений.

Вместе с тем, имеется ряд замечаний, касающихся представления результатов работы..

1. В работе представлено большое количество результатов по получению формиатдегидрогеназ с улучшенными свойствами. Было бы полезно представить полученные данные в виде одной общей таблицы.

2. В диссертации приводятся данные о влиянии некоторых ионных жидкостей на свойства ферментов. При этом выбор именно таких ионных жидкостей недостаточно обоснован.

3. Также в тексте диссертации и автореферата имеются опечатки.

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

5. Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертации представлены в 16 статьях, опубликованных в рецензируемых международных системах, индексируемых в Web of Science и Scopus. Апробация работы проведена в виде 85 устных и стендовых сообщений на международных и российских научных конференциях. По результатам исследования получены 3 патента на мутантные формы ФДГ с улучшенными свойствами. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы А.А. Пометун «Структурно-функциональные взаимосвязи и белковая инженерия формиатдегидрогеназ» полностью отражают содержание диссертации.

6. Заключение

Содержание диссертации Пометун А.А. соответствует критериям, определяемым пп. 2.1-2.5 «Положения о присуждении учёных степеней Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова», и оформлено согласно Приложениям № 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова», а ее автор Пометун Анастасия Александровна заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент,
Директор ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии

Тел.: +7(495) 315-12-47

доктор биологических наук, профессор

Подпись А.С. Яненко заверяю:

С.В. Яроцкий

6