

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Голубева Игоря Владимировича  
«Структурно-функциональные исследования дрожжевой оксидазы D- аминокислот  
методом рационального дизайна», представленную на соискание ученой степени  
кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 –  
биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертационная работа Голубева Игоря Владимировича посвящена изучению структурно-функциональных взаимосвязей в белке оксидазы D- аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis*, а также получению мутантных форм этого фермента с улучшенными свойствами для биотехнологии с помощью рационального дизайна.

Мечта многих поколений биотехнологов научиться создавать идеальный биокатализатор в соответствии с потребностями технологического процесса казалось бы уже близка. Успехи биохимии по выделению чистых ферментов, разработке методов кристаллизации белков, разрешению структур многих ферментов, массовое секвенирование, а также успехи генетической инженерии по введению одиночных замен, получению мутантных форм, а также методы направленной эволюции (мутантный ПЦР, шафлинг) создали предпосылки к решению проблемы создания идеального биокатализатора, исходя из рациональных подходов. Однако в реальности все оказалось значительно сложнее. Прежде всего, из-за недостатка фундаментальных знаний о механизмах действия ферментов, вкладе различных аминокислотных остатков в стабильность и каталитические характеристики фермента. Настоящая работа, прежде всего, устраняет пробелы в наших знаниях о структурно-функциональных взаимосвязях в отношении одного из востребованных в биотехнологии ферментов – оксидазы D-аминокислот, а также демонстрирует возможности метода рационального дизайна для получения мутантных форм фермента с улучшенными свойствами.

### *Актуальность темы диссертации*

Актуальность темы работы, прежде всего, связана со значением объекта работы-фермента оксидазы - D- аминокислот для фундаментальных исследований – в качестве модельного фермента для изучения особенностей целого класса ферментов – FAD-зависимых оксиредуктаз, а также прикладных задач, связанных с медициной (поиски ингибиторов ферментов, которые могут применяться в качестве лекарственных

препаратов для терапии нейродегенеративных заболеваний) и производством антибиотиков цефалоспоринового ряда. Результаты исследований структурных особенностей фермента и разработки рациональных подходов к получению новых форм фермента с улучшенными технологическими характеристиками являются востребованными и актуальными как для энзимологов, так и для практических биотехнологов.

*1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.*

На основании проведенной исследовательской работы автором сделано 8 выводов. Все выводы диссертационной работы Голубева И. В. базируются на большом экспериментальном материале, соответствуют поставленным в диссертации задачам и полностью отражают результаты работы. В работе использован широкий круг методов биохимии, генетики и молекулярной биологии, который позволил получить надежные результаты. Используемые в данной работе методы рационального дизайна ферментов, анализа структуры ферментов *insilico*, геной инженерии являются современными, в полной мере, соответствующими мировому уровню исследований. Они характеризуются высокой надежностью и воспроизводимостью, что позволяет соотносить результаты, полученные в диссертационной работе Голубева И. В., с результатами других научных групп. В этой связи достоверность каждого результата и вывода диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа обладает несомненной новизной. В ней реализованы уникальные подходы и большой опыт в изучении ферментов, накопленный на кафедре химической энзимологии МГУ. Впервые осуществлен детальный сравнительный анализ четвертичных структур оксидаз D-аминокислот различного происхождения, включая оксидазу из дрожжей *Trigonopsis variabilis*, структура которой была определена в лаборатории, где выполнялась работа. С помощью направленного мутагенеза введено свыше 40 замен в области каталитического центра и FAD-связывающего домена фермента. Выявлены аминокислотные остатки в структуре фермента, влияющие на субстратную специфичность, стабильность и активность в отношении различных субстратов. Детальный анализ свойств мутантных вариантов позволил обнаружить ферменты с повышенной температурной стабильностью и каталитической активностью. Получен мутант фермента TvDAAOE32R/F33D/M104F с температурной стабильностью в 10 раз превышающей исходный фермент, что является на данный момент абсолютным рекордом для ферментов этой группы.



## *2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.*

Автором получены результаты, имеющие важное значение для исследования структуры, механизма действия целого класса оксиредуктаз. На примере фермента TvDAAO продемонстрированы возможности методов рационального дизайна для изучения структурно-функциональных взаимосвязей в белках и получения мутантных форм фермента с улучшенными характеристиками.

В практическом плане представляют значительный интерес полученные автором мутантные формы TvDAAO с повышенной температурной стабильностью, увеличенной каталитической активностью и измененным спектром субстратной специфичности. Прежде всего, такие формы могут оказаться полезными для каталитического дезаминирования цефалоспарина С, важнейшей стадии получения антибиотиков цефалоспаринового ряда.

## *3. Содержание диссертации.*

Диссертационная работа Голубева И. В. построена по традиционному плану, изложена на 246 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав, описывающих материалы и методы исследований, результаты и их обсуждение, выводов и списка литературы, включающего 192 источника. В целом диссертация носит законченный характер, отлично иллюстрирована, содержит 72 рисунка и 40 таблиц.

Цели, задачи, актуальность, научно-практическая значимость проводимого исследования описаны во введении к диссертационной работе. В обзоре литературы Голубев И. В. детально рассматривает всю информацию, касающуюся оксидаз D-аминокислот, начиная с истории открытия, особенностей структуры, каталитических свойств и применения в тонком органическом синтезе, а также для терапии различных заболеваний. Наиболее полно проведен анализ результатов по белковой инженерии оксидаз D-аминокислот из различных источников. Обзор литературы свидетельствует, что диссертант прекрасно ориентируется в предмете изучения и способен на основе анализа литературы сформулировать цели и новые задачи по изучению фермента.

Диссертант в полном объеме представил описание материалов и методов, применяемых в диссертационной работе, что позволит использовать разработанные подходы другими исследовательскими коллективами. Сразу необходимо отметить, что все задачи, предусмотренные диссертационной работой (исследование роли остатков в области активного центра, оптимизация структуры FAD-связывающего домена,

повышение термостабильности и получение мутантных форм TvDAAO с улучшенными свойствами) выполнены в полном объеме. Достоверность и обоснованность полученных результатов не вызывает сомнений. Для решения каждой задачи были использованы оптимальные методы исследования.

В рамках выполнения первой задачи - исследование роли остатков в области активного центра - следует отметить блестяще проведенный анализ структур ферментов, включая сравнительный анализ аминокислотных последовательностей –множественное выравнивание, построение трехмерных структур, наложение структур, позволивший выявить остатки - мишени для белковой инженерии. В первую очередь, это касается положений Met104, Phe54 и Phe258. Последующие эксперименты, введение замен в эти положения и оценка каталитических свойств, полностью подтвердили предсказание и продемонстрировали исключительную роль Met104 в каталитических свойствах и температурной стабильности.

В рамках выполнения второй задачи - оптимизации структуры FAD- связывающего домена, реализован оригинальный подход к повышению термостабильности фермента за счет усиления связывания FAD с молекулой фермента. И в этом случае диссертанту удалось предсказать аминокислотные остатки для белковой инженерии на основе анализа структуры FAD- связывающего домена. В результате выполнения этой части работы был получен мутант с двойной заменой E32R/F33D, который обладал повышенной термостабильностью и улучшенными каталитическими свойствами. Объединение замен E32R/F33D и M104F позволило получить фермент с выдающейся термостабильностью в 10 раз превосходящий по этому показателю исходный фермент.

В рамках выполнения третьей задачи -повышение термостабильности и получение мутантных форм TvDAAO с улучшенными свойствами путем комбинирования точечных замен, необходимо отметить важные для биоинженерии ферментов наблюдения: нарушение аддитивности в отношении каталитических характеристик (аддитивное влияние разных замен на каталитические характеристики наблюдается не с каждым субстратом) и в кофермент-связывающем домене. В то же время была отмечена аддитивность влияния разных мутаций на термостабильность. Полученные результаты прекрасно иллюстрированы с использованием цветной печати, что существенно улучшает анализ материала. В целом отсутствуют замечания к экспериментальной части работы. В то же время после анализа материалов диссертации остается чувство неудовлетворенности в связи с тем, что диссертант не представил результатов тестирования полученных мутантов с цефалоспарином С – наиболее важным субстратом для этих ферментов.



4. *Опубликование результатов диссертации в научной печати.*

Результаты и выводы диссертационной работы Голубева И. В в полном объеме представлены в печатных работах - 5 статьях, опубликованных в российских и зарубежных научных журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях, что нашло отражение в 25 тезисах докладов.

5. *Содержание автореферата.*

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

6. *Заключение.*

Диссертационная работа Голубева И. В. «Структурно-функциональные исследования дрожжевой оксидазы D- аминокислот методом рационального дизайна», имеет важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов биохимии и биотехнологии, и отвечает всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор Голубев Игорь Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заместитель директора по научной работе

Государственного научного центра РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»  
(117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1)

[www.genetika.ru](http://www.genetika.ru), тел. 8(495)3151247,

e-mail оппонента: [yanenko@genetika.ru](mailto:yanenko@genetika.ru)

доктор биологических наук, профессор

  
20.11.2014

Яненко А.С.

Подпись д.б.н., профессора Яненко А.С. заверяю

Ученый секретарь

Государственного научного центра РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»,  
Кандидат химических наук



Воюшина Т.Л.