



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

12.11.14 № ВР-2471-911

на № _____ от _____



ОТЗЫВ

ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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 специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Исследование взаимосвязи между структурой и свойствами ферментов является одним из актуальных направлений современной науки. Проведение подобных исследований позволяет не только детально изучать механизмы действия ферментов, но и разрабатывать подходы по направленному изменению свойств природных ферментов для решения конкретных биотехнологических задач.

Фермент, который является объектом исследования в диссертационной работе Голубева И.В., оксидаза D-аминокислот, широко распространен в живых организмах, где выполняет важные и весьма разнообразные физиологические функции. Например, в микроорганизмах фермент участвует в метаболизме экзогенных D-аминокислот, а в клетках высших животных, и в том числе человека, основная его функция заключается в поддержании определенного уровня различных D-аминокислот в клетках мозга, легких, печени, почек и т.д. В свою очередь D-аминокислоты принимают участие в регуляции функционирования нервной системы и ряда других важных процессов. Например, в настоящее время показана связь между активностью оксидазы D-аминокислот в клетках мозга человека и развитием ряда таких социально важных заболеваний, как шизофрения, болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также раковых заболеваний. В этом направлении в настоящее время ведутся интенсивные исследования. Способность DAAO

стереоспецифично окислять только D-аминокислоты делает ее крайне перспективной для разработки биосенсоров для ранней клинической диагностики и мониторинга описанных заболеваний. Стоит подчеркнуть, что биосенсоры на основе DAAO также перспективны для применения в аналитической биотехнологии для проведения анализа содержания D-аминокислот в пищевых продуктах, что позволяет определять наличие бактериального заражения и качество продуктов питания. Задача создания биосенсоров осложняется широким спектром субстратной специфичности природных оксидаз D-аминокислот. Кроме того, в настоящее время DAAO находит широкое применение в других областях биотехнологии, например, в процессах тонкого органического синтеза для получения α -кетокислот и неприродных L-аминокислот, являющихся субстратами для синтеза биологически активных препаратов. Особо следует отметить использование DAAO в биокаталитическом процессе получения из цефалоспориноса С 7-амино-цефалоспориновой кислоты (7-АЦК) - исходного синтона для получения полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. Данные препараты крайне востребованы и занимают четвертую часть рынка всех продаваемых антибиотиков в настоящее время. Поскольку природные ферменты обладают невысокой активностью с неканоническими субстратами, то повышение каталитической активности DAAO с цефалоспорином С является важной биотехнологической задачей. Приведенные ограничения применения фермента могут быть устранены методами белковой инженерии путем получения мутантных форм фермента с необходимыми свойствами.

Исследования оксидазы D-аминокислот проводятся уже не один десяток лет в нескольких лабораториях мира. Первое направление исследований заключается в изучении физиологической роли DAAO в организме человека (hDAAO) и поиске новых ингибиторов этого фермента, которые могут применяться в качестве лекарственных препаратов в терапии нейродегенеративных заболеваний. Этим, например, объясняется рост количества депонированных трехмерных структур DAAO в базу данных трехмерных структур PDB за последние несколько лет. Второе направление исследования DAAO направлено на оптимизацию свойств природных ферментов для целей биотехнологии. В качестве основы для своих экспериментов исследователи выбрали ферменты из дрожжей, в первую очередь из *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) и *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO). Наиболее перспективным является TvDAAO, поскольку он проявляет наиболее высокую активность со многими гидрофобными субстратами и цефалоспорином С, а также обладает наиболее высокой стабильностью. Однако для данного фермента за исключением лаборатории генетической инженерии и дизайна белков на Химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова до сих пор не проводилось систематических исследований по изучению роли отдельных аминокислотных остатков в каталитических свойствах и стабильности фермента и получению мутантных форм фермента с заданными свойствами. Это в частности объясняется отсутствием

трехмерной структуры TvDAAO в течение длительного времени, в то время как для DAAO из человека и дрожжей *R.gracilis* структуры давно известны. Однако важным моментом является то, что проведение экспериментов по белковой инженерии DAAO из дрожжей *R.gracilis* в течение последних 10 лет так и не привело к созданию высокоэффективных биокатализаторов на его основе. Определение трехмерной структуры TvDAAO сотрудниками лаборатории генетической инженерии и дизайна белков создало основу для систематического исследования этого фермента методом рационального дизайна. Также необходимо подчеркнуть, что DAAO является очень важным ферментом с точки зрения фундаментальных исследований структуры, механизма действия и стабильности, поскольку выступает в качестве модельного фермента для класса FAD-зависимых оксидоредуктаз.

В свете вышесказанного, диссертационная работа Голубева И.В., посвященная изучению взаимосвязи структуры и функции оксидазы D аминокислот из дрожжей *T.variabilis*, является актуальной и практически значимой. В своей работе диссертант продолжил систематические исследования TvDAAO и решал следующие задачи: изучение роли остатка Met104 и соединительной петли в области активного центра фермента в каталитических свойствах и стабильности фермента, изучение взаимодействия между остатками Phe54, Met104 и Phe258 в активном центре фермента, оптимизация структуры FAD-связывающего домена, объединение наиболее успешных точечных аминокислотных замен для получения многоточечных мутантных ферментов со значительно улучшенными свойствами.

Диссертационная работа Голубева И.В. построена по традиционной схеме. Она состоит из следующих разделов: Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и их обсуждения, Выводов и Списка литературы. Диссертация изложена на 246 страницах, включает 72 рисунка, 40 таблиц и 192 литературные ссылки.

Обзор литературы состоит из нескольких частей. Первая часть посвящена общим сведениям о ферменте, его физиологической роли в различных организмах и детальному рассмотрению имеющиеся в настоящее время данных о первичной и четвертичной структуре фермента из различных источников. Последующие несколько глав Обзора литературы описывают имеющиеся на данный момент сведения о каталитических свойствах, стабильности и практическом применении фермента в биотехнологии. Заключительная глава освещает эксперименты по белковой инженерии, которые были проведены до настоящего времени различными группами исследователей для оксидаз D-аминокислот с известными трехмерными структурами. Хочется подчеркнуть, что для наглядности и простоты восприятия материала все данные по нескольким различным ферментам систематизированы в соответствующих таблицах. В целом Обзор литературы хорошо построен и дает подробное представление о текущем состоянии проблемы. Из Обзора литературы логично вытекают поставленные цели и задачи диссертационной работы Голубева И.В.

В разделе Материалы и Методы описаны материалы, которые были использованы автором в его исследовании, и приведено подробное описание современных методов, использованных в работе. Этот раздел свидетельствует о том, что данная диссертационная работа охватывает различные области современной науки и говорит о большом объеме проведенных исследований и высокой квалификации автора в области биоинформатики, современной молекулярной биологии и биохимии, а также химической энзимологии, физической химии и микробиологии.

Раздел результаты и их обсуждение состоит из четырех глав. Все главы построены по единой схеме. В каждой главе подробно описаны анализ трехмерной структуры фермента, выбор положений для направленного мутагенеза, эксперименты по компьютерному моделированию потенциальных мутантов и выбору наиболее перспективных аминокислотных замен, получение мутантных ферментов и подробное изучение их свойств. Результаты всех экспериментов проиллюстрированы на соответствующих рисунках, графиках, диаграммах и систематизированы в соответствующих таблицах.

В первой главе Обсуждения результатов выполнено сравнение известных трехмерных структур DAAO, выявлены наиболее значимые структурные отличия и проведено подробное изучение роли остатка Met104 и соединительной петли в области активного центра в каталитических свойствах и стабильности оксидазы D аминокислот. В данном разделе автором получено 10 мутантных форм TvDAAO с точечными аминокислотными заменами и 1 мутант TvDAAO с делецией. Все мутанты были получены в активной и растворимой форме, очищены до гомогенного состояния и подробно изучены. В результате автору удалось получить термостабильную мутантную TvDAAO за счет замены Met104Phe, которая по стабильности превосходила все ранее описанные мутантные и природные DAAO.

Во второй главе для изучения взаимодействия между остатками Phe54, Met104 и Phe258 в области активного центра получено 7 мутантных TvDAAO с двойными аминокислотными заменами в указанных положениях. Свойства мутантных ферментов подробно изучены и приведены в сравнении с точечными предшественниками. Автор подробно проанализировал результаты, полученные в первой и второй главе, провел развернутое обсуждение и сделал выводы о природе взаимодействий между остатками в активном центре и возможных причинах повышения температурной стабильности TvDAAO.

В третьей главе Обсуждения результатов проведены эксперименты по оптимизации структуры FAD-связывающего домена TvDAAO. На основании комплексного анализа структуры TvDAAO и других DAAO в области связывания FAD были выбраны 4 положения для направленного мутагенеза. В результате проведенного скрининга полученных мутантов по температурной стабильности автор остановился на 2 соседних аминокислотных остатках и провел их подробное изучение. В общей сложности было получено 13 мутантных TvDAAO. В результате введения двойной замены Glu32Arg/Phe33Asp была повышена температурная стабильность TvDAAO в

несколько раз. Стоит отметить, что полученная термостабильная мутантная TvDAAO обладала также повышенной каталитической активностью с большинством субстратов. Таким образом, автором был получен важный практический результат – повышена стабильность фермента не только без потери, а даже с увеличением каталитической активности. Кроме того, данная часть работы является хорошим примером использования метода рационального дизайна, когда результаты компьютерного моделирования нашли подтверждение в эксперименте.

Четвертая глава Обсуждения результатов заключалась в объединении наиболее успешных точечных аминокислотных замен, полученных автором в ходе его диссертационной работы, а также в предыдущих работах лаборатории, в многоточечные мутантные TvDAAO с целью усиления положительных эффектов. Автор провел подробный анализ свойств точечных мутантных TvDAAO и расположения аминокислотных остатков в структуре фермента, и выбрал различные комбинации для объединения. В ходе экспериментов было получено 9 мутантных TvDAAO с многоточечными аминокислотными заменами, которые обладали значительно увеличенной каталитической активностью с рядом субстратов и более узким спектром субстратной специфичности. Все мутантные ферменты обладали повышенной стабильностью относительно природной TvDAAO. Необходимо подчеркнуть, что объединение замен Glu32Arg/Phe33Asp и Met104Phe повысило стабильность TvDAAO в более, чем 10 раз. В заключении главы автор проводит оценку аддитивности введения нескольких аминокислотных замен в структуру фермента и подробно обсуждает полученные результаты.

Всего автором в диссертационной работе было получено 40 мутантных форм оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis*, большинство из которых были выделены, очищены до гомогенного состояния и подробно изучены. Полученные автором результаты представляют, как фундаментальный интерес, с точки зрения взаимосвязи структуры и функции фермента, так и имеют важное практическое значение, поскольку мутантные TvDAAO могут быть использованы для создания селективных биосенсоров и в процессах тонкого органического синтеза.

Необходимо отметить аккуратное и наглядное оформление всех рисунков, графиков, диаграмм и таблиц, что значительно упрощает восприятие большого количества экспериментального материала. Работа написана грамотным научным языком и выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях с использованием самых современных и разносторонних методов исследования из различных областей науки (биохимия, биотехнология, молекулярная биология, микробиология, химическая энзимология, физическая химия, биоинформатика и др.). Результаты диссертации конкретны и 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 структура-функция в оксидазах D-аминокислот и в развитие метода рационального дизайна для создания биокатализаторов на основе DAAO.

При ознакомлении с работой возникли следующие замечания и пожелания:

- во всей работе автор использует как трехбуквенное, так и однобуквенное обозначение аминокислотных остатков и аминокислотных замен в тексте и на рисунках. Было бы более удобным использование только трехбуквенного кода обозначения аминокислот;
- в разделе Результаты и их обсуждение автор не всегда уделяет должное внимание обсуждению возможных изменений структуры фермента в результате введения аминокислотных замен;
- объем диссертации превышает общепринятый объем для кандидатских диссертаций, что несколько усложняет восприятие представленного материала.

Данные замечания ни коим образом не снижают общую положительную оценку работы, которая выполнена на высоком профессиональном уровне. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных. Особо следует подчеркнуть объем экспериментальной работы, который значительно превышает таковой для стандартных кандидатских диссертаций, что отражается в количестве публикаций по теме диссертации – 5 статей в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ и 25 тезисов докладов на российских и международных конференциях и симпозиумах. Автореферат и публикации полностью отражают 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. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институте биохимии им. А.Н. Баха 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.

Диссертационная работа Голубева И.В. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым в пунктах 9-14 «Постановления о порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор безусловно заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв был заслушан и одобрен на заседании лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН 6 ноября 2014 г.

Заведующий лабораторией биокатализа
Института биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
член-корреспондент РАН,
доктор химических наук, профессор



А.Г.Габибов