

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Юрченко Татьяны Сергеевны на тему
«Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук
по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Диссертационная работа Юрченко Т.С. посвящена исследованию фермента формиатдегидрогеназы из бактерий *Staphylococcus aureus* и, прежде всего, выяснению его структурно-функциональных особенностей при помощи методологии рационального дизайна. Данная работа выполнена в научном коллективе, который уже многие годы проводит исследование бактериальных формиатдегидрогеназ. Исследование формиатдегидрогеназы из нового источника – патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* позволяет по новому взглянуть на роль этих ферментов для жизнедеятельности клеток.

Актуальность темы диссертации

Актуальность темы диссертационной работы Юрченко Т.С. обусловлена значимостью этого фермента как для медицины, так и для биокатализа. Сегодня формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus* может рассматриваться в качестве альтернативной мишени для борьбы с этим патогеном. В то же время, формиатдегидрогеназы широко используется в органическом синтезе как катализатор регенерации никотинамидных кофакторов. Исследование нового фермента с уникальным набором свойств является актуальной задачей как для решения фундаментальных задач (анализ структурно-функциональных взаимоотношений), так и для прикладных исследований (создание более эффективных биокатализаторов регенерации НАДН).

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

Все выводы диссертационной работы Юрченко Т.С. обоснованы и базируются на большом экспериментальном материале, полностью отражают результаты работы. Достоверность результатов и выводов диссертационной работы не вызывает сомнений, т.к. основана на использовании надежных и воспроизводимых методов белковой инженерии и биохимии. Впервые получены мутантные варианты формиатдегидрогеназы из *S. aureus* с измененными каталитическими свойствами: замена V119A привела к снижению константы Михаэлиса по отношению к NAD⁺ и HCOO⁻ в 2,5 и 1,6 раз, соответственно по сравнению с ферментом дикого типа. В то же время, замена Phe в 194 положении на менее объемный остаток Val привела к снижению констант Михаэлиса по

NAD⁺ и формиату в 4 и 2 раза, соответственно. Кроме того, впервые удалось с помощью оптимизации состава реакционной среды снизить для фермента константу Михаэлиса по NAD⁺ и увеличить каталитическую константу. Таким образом, генерация большого пула измененных вариантов фермента позволила диссертанту значительно улучшить свойства фермента.

Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

В диссертационной работе Юрченко Т.С. впервые были изучены структурно-функциональные связи на примере формиатдегидрогеназы из *S. aureus*: впервые показано значение пост-трансляционной модификации белка для формирования зрелого фермента со специфической активностью; идентифицированы аминокислотные остатки, влияющие на каталитические свойства фермента. Таким образом, результаты данной работы являются существенным дополнением к картине систематического исследования формиатдегидрогеназ из различных источников.

С практической точки зрения результаты работы могут быть использованы для создания ферментативных систем регенерации NADH. В свою очередь изотопно-меченые образцы формиатдегидрогеназы из *S. aureus* могут быть использованы для поиска альтернативных методов борьбы патогенными бактериями *S. aureus*.

Содержание диссертации.

Диссертационная работа Юрченко Т.С. построена по традиционному плану, изложена на 128 страницах. Работа состоит из введения, обзора литературы, разделов «материалы и методы», результаты и их обсуждение, заключения и списка литературы, включающего 120 источников. В целом диссертация носит завершённый характер, хорошо иллюстрирована, содержит 27 рисунков и 41 таблицу.

Во введении диссертации приведены цели и задачи работы, обоснована её актуальность, научно-практическая значимость проводимого исследования, описаны объекты, методы и методология исследования, представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулирован личный вклад автора, перечислены положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы подробно рассмотрены эпидемиологические проблемы, связанной с *Staphylococcus aureus* и, прежде всего, представлены основные методы борьбы с биопленками. Далее, дана подробная информация об основных свойствах

формиатдегидрогеназ из различных источников, их аминокислотные последовательности, структуры. В заключении диссертант рассматривает основные направления рационального дизайна формиатдегидрогеназ. Обзор литературы свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в проблеме, способен на критический анализ и обобщения. Единственное замечание к этой части работы связано с тем, что диссертант уделяет значительное внимание бактериям *Staphylococcus aureus* и их патогенезу, хотя далее эти материалы не используются диссертантом.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые материалы и генно-инженерные методы конструирования плазмидных векторов, молекулярно-биологические методы работы со штаммами-продуцентами, а также биохимические методы выделения и очистки белков (хроматография, электрофорез, спектрофотометрия).

Глава «Результаты» состоит из четырех разделов, включая:

- Исследование влияния N-концевой последовательности на свойства и уровень экспрессии формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*;
- Исследование влияния компонентов буферной системы на каталитические свойства фермента;
- Рациональный дизайн активного центра формиатдегидрогеназы с применением как хорошо зарекомендовавших себя подходов, так и новых;
- Получение изотопно-меченых образцов формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*, содержащих ^2H , ^{13}C , ^{15}N .

В каждом из этих разделов автору удалось получить ряд новых результатов, имеющих принципиальное значение для изучения формиатдегидрогеназ. Важнейшим результатом первого раздела является доказательство посттрансляционной модификации N-концевого фрагмента для формирования активной формы фермента. Результат второго раздела – повышение каталитических свойств фермента SauФДГ за счет оптимизации состава и концентрации компонентов реакционной смеси. Этот очень важный практический результат может быть рекомендован для использования в системах регенерации кофактора. Наиболее значимые результаты получены в третьем разделе. Методами белковой инженерии были получены 25 мутантных вариантов фермента и изучены их каталитические свойства. Только в 2 случаях диссертанту удалось снизить константу Михаэлиса, что очень важно для практического применения. Вместе с тем следует отметить огромную работу диссертанта, который получал не только одиночные, но и двойные мутанты, каждый из которых детально подвергался анализу. Можно только сожалеть, что автору не удалось получить идеальный биокатализатор, работающий с

NADPH. Такой фермент востребован в промышленной биотехнологии. Будем это рассматривать как пожелания для дальнейшей работы.

Наконец, в последнем разделе автором были получены образцы фермента, меченые стабильными изотопами 2H , 15N , 13C , которые могут использоваться в исследовании структуры и поиска перспективных ингибиторов методом ЯМР. Здесь следует отметить большую сложность мечения дейтерием. Как правило, добавление дейтерия приводит к сильному ингибированию роста. Диссертант успешно справилась с этой работой. Замечание по этому разделу сводится к необходимости продемонстрировать большую связь этой части работы с остальными. Сегодня эта часть кажется случайной. Это замечания носит скорее рекомендательный характер и не влияет на общую высокую оценку выполненной работы.

Содержание диссертационной работы соответствует паспорту специальностей 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Опубликование результатов диссертации в научной печати.

Результаты и выводы диссертационной работы Юрченко Т.С. в полном объеме представлены в печатных работах - 5 статьях, опубликованных в высокорейтинговом международном (*Biochimie*) и российских журналах, рекомендованных ВАК АК МОН РФ. Материалы диссертации неоднократно представлялись на международных и отечественных конференциях.

Содержание автореферата.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Заключение.

Диссертационная работа Юрченко Татьяны Сергеевны на тему «Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*» является завершенным научным исследованием, которое по актуальности проведенного исследования, уровню решения поставленных задач, новизне, научной и практической значимости полученных результатов соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), а ее автор, Юрченко Татьяна Сергеевна, заслуживает

присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям
1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент

Заместитель руководителя Курчатовского комплекса
НБИКС-природоподобных технологий по научной работе,
доктор биологических наук по специальности
1.5.7. – «генетика», 1.5.11. – «микробиология», профессор

А.С. Яненко

Рабочий телефон: +7 (499) 196-90-53
Адрес электронной почты: Yanenko_AS@nrcki.ru
Адрес: 123182, пл. Академика Курчатова, 1, Москва

Подпись д.б.н., проф. Яненко А.С. заверяю
Главный ученый секретарь
НИЦ «Курчатовский институт»



К.Е. Борисов

«18» октября 2024 г.