



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

Исх. от 18.10.2024 № 12312-13/423

На № _____ от _____



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Актуальность темы исследования

NAD(P)⁺-зависимая форматдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2) катализирует реакцию окисления формат-иона до углекислого газа с сопряженным восстановлением NAD(P)⁺ до NAD(P)H. Гены форматдегидрогеназы обнаружены в организмах представителей царств бактерий, грибов и растений. Это говорит о том, что данный фермент появился на ранних этапах эволюционного развития живых организмов и играет значимую физиологическую роль в их жизнедеятельности. При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды показан рост количества мРНК и активности ФДГ у растений, бактерий, в частности – в биопленках *Staphylococcus aureus*. Помимо этого, наблюдается рост экспрессии генов ферментов, ответственных за наработку формата (пируватформат-лиаза). Таким образом, клетки *S. aureus* в биопленках получают энергию преимущественно по форматному пути.

S. aureus – это анаэробные грам-положительные бактерии из семейства *Staphylococcae*. Данный патоген является возбудителем заболеваний, протекающих с различной степенью тяжести: как опасные для жизни, так и протекающие бессимптомно. Сложность борьбы обусловлена широким спектром факторов вирулентности и быстро распространяющейся устойчивости к новым антибактериальным препаратам. Так как формиатдегидрогеназа – один из ключевых ферментов метаболизма *S. aureus* в состоянии биопленок, его можно рассматривать в качестве перспективной мишени для подбора конкурентных ингибиторов.

На данный момент применение формиатдегидрогеназы в качестве катализатора регенерации никотинамидных кофакторов NAD(P)H в ферментативных системах стало традиционным. Использование ферментативной стадии в органическом синтезе оптически активных соединений помогает решить проблему получения энантиомерно чистого вещества. Большой интерес для технических процессов представляют NAD(P)⁺-зависимые оксидоредуктазы. Однако из-за высокой стоимости никотинамидных кофакторов их стехиометрическое использование экономически нецелесообразно. Вследствие этого, требуется эффективная регенерация кофакторов *in situ*. Наиболее перспективными стратегиями являются ферментативные способы регенерации никотинамидных кофакторов, так как их отличает высокая селективность и скорость реакции. Формиатдегидрогеназа выгодно выделяется среди других дегидрогеназ, так как основным субстратом является коммерчески доступный формиат, а продуктом реакции – диоксид углерода, не требующий дополнительных стадий очистки.

Таким образом, изучение формиатдегидрогеназ с уникальной последовательностью имеет как практический интерес, так как среди данных ферментов могут быть обнаружены перспективные востребованные на данный момент биокатализаторы и охарактеризованы условия их работы, так и научный – исследование взаимосвязи структура-функция методом рационального дизайна и выявление перспективных стратегий направленного мутагенеза. В связи с этим тема диссертационной работы Т.С. Юрченко, безусловно, является актуальной.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Изучено влияние N-концевой аминокислотной последовательности на уровень экспрессии и свойства SauФДГ. Впервые получена форма белка SauФДГ, содержащая полную аминокислотную последовательность, что подтверждено при помощи тандемной

MALDI TOF/TOF спектрометрии. В рамках данного исследования была разработана комбинированная буферная система, приводящая к снижению константы Михаэлиса по NAD^+ и увеличению каталитической константы SauФДГ . Проведено обширное исследование взаимосвязи структура-функция активного центра формиатдегидрогеназы из *S. aureus*. В ходе данного исследования были предложены новые подходы к проведению рационального дизайна и проведена апробация более ранних подходов, ставших традиционными для NAD^+ -зависимых формиатдегидрогеназ. Помимо этого, были получены высоко изотопно-меченые образцы формиатдегидрогеназы из *S. aureus* с высокой степенью включения изотопов, достаточной для получения ЯМР спектров высокого качества.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Научные положения и выводы диссертационной работы Т.С. Юрченко являются полностью обоснованными, а полученные результаты не вызывают сомнения. В работе использован широкий круг современных методов генетической инженерии, микробиологии, биоаналитических методов, а также спектрофотометрические методы анализа при физико-химической характеристике объекта исследования. Эксперименты проведены на высоком методическом уровне, а полученные результаты достоверны. Все результаты диссертационной работы Т.С. Юрченко опубликованы в 5 научных статьях в научных изданиях, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК и 11 тезисах международных и всероссийских конференций.

Структура и содержание работы

Диссертация Т.С. Юрченко написана по традиционному плану и включает разделы: общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Материал работы изложен на 128 страницах, содержит 27 таблиц, 41 рисунок и 120 ссылок.

В разделе “Общая характеристика работы” автор описывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, обосновывает научную новизну и научно-практическую значимость работы. Также в данном разделе приводятся сведения об апробации работы на научных конференциях и о публикациях, содержащих результаты по теме диссертации.

Раздел “Обзор литературы” начинается с описания патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и актуальных методов борьбы с данным патогеном. Затем автор

знакомит читателя с общими сведениями о NAD^+ -зависимых формиатдегидрогеназах и приводит сравнительную характеристику аминокислотных последовательностей формиатдегидрогеназ из различных таксономических групп и их каталитических свойств. В завершении раздела «обзор литературы» широко освещается рациональный дизайн формиатдегидрогеназ с целью снижения констант Михаэлиса, замены коферментной специфичности и увеличения химической и температурной стабильности. Обзор свидетельствует об осведомленности автором научной работы об актуальных исследованиях в области рационального дизайна формиатдегидрогеназ; об интересе автора к поиску альтернативных методов борьбы с патогенным *S. aureus*. Обзор литературы дает читателю представление об исследуемом объекте.

В разделе “Материалы и методы” описаны многочисленные методы, используемые в работе. Работа проведена с применением современных молекулярно-биологических, биохимических и физико-химических методов, таких как: полимеразная цепная реакция, молекулярное клонирование, электрофорез, хроматография, спектрофотометрия. Результаты обрабатывались методами линейной и нелинейной регрессии. Используемые методические подходы адекватны поставленным в работе задачам.

В разделе “Результаты и обсуждение” описаны и проанализированы собственные результаты исследования. Результаты изложены в 4 частях, соответствующих основным направлениям исследований.

Первая часть главы «результаты и обсуждение» посвящена исследованию влияния N-концевой последовательности на уровень экспрессии и свойства рекомбинантной SauФДГ.

Во второй части представлено исследование влияния состава и концентрации компонентов буферных систем на каталитические свойства SauФДГ.

В третьей части автором проведено детальное исследование взаимосвязи структура-функция как в каталитическом, так и кофермент-связывающем домене активного центра. Для этого автором были выполнены получение генетических конструкций, экспрессия, хроматографическая очистка и характеристика полученных ферментов. Проведено сравнение свойств новых мутантных форм с ферментом дикого типа. Для двух мутантных форм, содержащих замены F194V и V119A показано снижение константы Михаэлиса по NAD^+ что являлось одной из задач исследования.

В четвертой части описывается методика получения высоко-изотопно меченных

стабильными ^2H , ^{13}C , ^{15}N образцов форматдегидрогеназы из *S. aureus* для поиска перспективных ингибиторов. Поскольку данный фермент является одним из ключевых в жизнедеятельности биопленок патогена, форматдегидрогеназу можно рассматривать как потенциальную мишень. Такой способ борьбы с серьезным патогеном был бы альтернативой использованию антибиотиков в условиях возрастающей резистентности.

В разделе “Заключение” обобщены и оценены результаты проведенного исследования; “Выводы” работы полностью обоснованы.

Замечания и вопросы по диссертационной работе:

1. На рис.1.2.3.1. и рис.1.2.3.2. представлены выравнивание аминокислотных последовательностей форматдегидрогеназ из различных источников и филогенетическое древо соответственно. В тексте литературного обзора автором не уточняется, по какому принципу выбирались организмы для проведения сравнения последовательностей.
2. В разделе «Материалы и методы» некоторые разделы можно было расположить более оптимальным способом: п.2.2.6. и 2.2.8. следовало расположить непосредственно перед п.2.2.11. поскольку, в них описывается работа с клеточными культурами.
3. Низкое качество рис.3.1.7, рис. 3.1.8. и рис. 3.1.2. Таблицы 3.3.1.1., 3.3.2.1.,3.3.2.2., 3.3.3.1. и 3.3.3.2. несколько отличаются по оформлению от остальных в работе.

Помимо этого, в тексте диссертационной работы имеется незначительное количество опечаток. Следует отметить, что вышеуказанные незначительные недостатки не снижают высокой оценки работы Т.С. Юрченко. Высказанные замечания носят рекомендательный характер. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные и написана хорошим научным языком. Полученные автором новые результаты могут быть полезны при работе в лабораториях, работающих в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии – в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, на Химическом и Биологическом факультетах и факультете Фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат полностью соответствует содержанию рассматриваемой диссертации,

результатам и положениям, выносимым на защиту.

Заключение. Диссертационная работа Т.С. Юрченко на тему «Рациональный дизайн формиатдегидрогеназы из *Staphylococcus aureus*» является законченной научно-квалификационной работой. Содержание работы соответствует специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология. По актуальности проблемы, научной новизне, объему и качеству выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа полностью соответствует современным требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с актуальными изменениями). а ее автор, Юрченко Татьяна Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв на диссертационную работу был заслушан и одобрен на совместном заседании лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, лаборатории биохимии вирусных инфекций и лаборатории химической регуляции биокатализа Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН 15 октября 2024 года.

Отзыв составил главный научный сотрудник, академик РАН С.Н. Кочетков



ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН)

Лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений

Тел. +7-985-776-98-44

e-mail snk1952@gmail.com

ВЕРНО

Ученый секретарь  Коновалова Е.В.

«18» октября 2024 г.

