

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, 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Любая диссертационная работа, равно как и отзыв оппонента на эту работу, традиционно начинается с ответа на вопрос, зачем делалась работа и какая польза от результата, то есть от описания актуальности тематики. Данная работа (и отзыв на нее), конечно, не являются исключением. Тем не менее, в определенном смысле эта работа нетипична, поскольку актуальность тематики в данном случае "распадается" на два аспекта, хотя и связанных общим объектом, но существующих как актуальные темы, не прямо связанные друг с другом. Первая и фундаментальная цель работы связана с тем, что изучаемый фермент - дрожжевая оксидаза D-аминокислот (ДААО) выполняет ряд важнейших функций в живых организмах, и ее изучение тесно связано с медициной, в частности с диагностикой (а в перспективе, возможно, и с лечением) шизофрени, паркинсонизма, болезни Альцгеймера и других психосоматических заболеваний, а также ряда онкологических болезней. Поиск адекватных и точных методов диагностики, и тем более лечения столь тяжелых заболеваний, безусловно, является актуальнейшей задачей.

С другой стороны, ДААО широко используется в целях решения биотехнологических задач, поскольку участвует в получении исходного субстрата (7-АЦК), который вовлечен в крупнотоннажное производство антибиотиков ряда цефалоспоринов. В данном случае мы уже имеем необходимость использования ДААО в промышленных масштабах. И хотя таким образом поставленные задачи, как правило, не рассматриваются как предмет фундаментальной науки - но в данном случае речь идет об усовершенствовании *инструмента* с целью улучшения, удешевления промышленного процесса, а инструментом является фермент, модификации которого с целью оптимизации его свойств принадлежат, безусловно, к опции фундаментальной науки.

Таким образом, отвечая на вопрос об актуальности изучения функциональной топографии дрожжевой ДААО и получения мутантных форм фермента, наиболее удовлетворяющих запросам как медицины, так и промышленности, мы должны рассматривать данную работу в двух сравнимых по важности аспектах.

Возможно, со столь широкими перспективами данной работы связан ее совершенно неординарный для кандидатских диссертаций объем - более 200 страниц. Особо следует отметить обзор литературы, где упомянуто все, включая перспективы участия ДААО в терапии нейродегенеративных и онкологических заболеваний и возможности использования этого фермента при усовершенствовании получения генно-модифицированных организмов. В результате литературный обзор представляет собой не только полезное, но и захватывающее "читиво". Единственное замечание к обзору - не стоило бы ссылаться на русские статьи в английском варианте, например "Biochemistry (Mosc)" вместо "Биохимия", и т.п.

Раздел "Материалы и методы" мне кажется неоправданно расширенным. Не вина автора, что огромное количество точечных и множественных мутантов, которые были получены и исследованы в данной работе, по сути, получают и исследуются в основном стандартными методами. В результате, видимо для того, чтобы "соблюсти пропорциональность" между объемом результатов и объемом применяемых методов, автор счел необходимым в ряде случаев подробно описывать общеизвестные протоколы выделения плазмид (вплоть до деталей использования соответствующего кита), постановки полиакриламидного геля по Лэммли и т.п. На мой взгляд, многие подробности в данном случае можно считать излишними.

В то же время объем представленных результатов впечатляет. Одно только количество мутантных форм создает впечатление, что работала целая фабрика. Не говоря уже о том, что многие из этих форм были подробно и всесторонне исследованы с точки зрения термостабильности (при этом количественно рассчитывались параметры стадий термоинактивации), и определены кинетические свойства мутантных форм. При этом следует отметить, что субстратом фермента является не одна какая-то D-аминокислота, а практически все. По меньшей мере, для 10-11 D-аминокислот кинетические параметры были изучены для каждой отдельной аминокислоты

(и при действии каждого мутанта!). Имея такую "матрицу", которая целиком заполнена добросовестно полученными количественными кинетическими параметрами - можно уже перестать удивляться столь большому объему работы - становится понятно, что в "стандартные" 100-150 страниц такое количество информации точно "не влезет".

Отдельно следует отметить методы, которые использовались для выбора сайтов мутагенеза. В заглавии диссертации этот подход обозначен как "метод рационального дизайна". Для выбора необходимых точек и участков белковой цепи было проведено всестороннее систематическое исследование ДААО из различных источников с применением целого ряда всевозможных баз данных и компьютерных программ.

Некоторые решения автора относительно выбора мутаций представляются недостаточно обоснованными. Так, например (стр.91), выбор десяти кандидатов на замену остатка Met104 не совсем понятен. С одной стороны, ясно, что эти остатки должны отличаться от нативного по самым различным параметрам, т.е. содержать (+) или (-) -заряды в боковой цепи, разной длины гидрофобные "хвосты", наличие или отсутствие ароматических, гидроксильных групп и т.д. В то же время среди 10 кандидатов оказались, например, валин, лейцин и изолейцин, которые достаточно близки по свойствам гидрофобной цепи, но не оказалось ни одной аминокислоты, содержащей амидный остаток (Glu есть, а Gln - нет). В этом случае мы не можем обсуждать возможную роль амидного остатка в указанном положении. Также явно "не хватает" собственно глицина (лишенного всех заместителей, но имеющего свойство значительно изменять пространственную структуру близлежащей цепи), и, хотелось бы, еще гистидина и пролина, как уникальных в своем роде. Конечно, "нельзя объять необъятное" - но этими аминокислотами можно было бы заменить валин или изолейцин.

Очень интересным результатом работы оказалось открытие роли кластера из трех ароматических колец, появившегося при мутации M104F. Это очень изящное построение нельзя не отметить. Убедительно показана роль ароматических остатков 54 и 258, проявляющаяся в "выборе" субстратов (исчезновение активности в одних случаях, и повышение в других).

Вторым подробно изученным участком фермента являлся FAD-связывающий фрагмент, в котором также были найдены ключевые

аминокислотные остатки, играющие принципиальную роль в катализе. И наконец, переходя непосредственно к решению практической задачи оптимизации свойств фермента как инструмента для производства цефалоспоринов, был получен очень большой набор множественных мутантов, содержащих замены как в каждом, так и одновременно в обоих изученных фрагментах белка.

Дискуссионным является вопрос о настоящей необходимости получения множественных мутантов, находящихся лишь в одном из двух кластеров. Собственно, результат можно было ожидать - если замена M104F приводит к стабилизации фермента, и к близкому эффекту приводят замены в положениях 105 и 108 - с большой вероятностью можно предположить, что тут работает один и тот же механизм стабилизации, следовательно, множественная замена вряд ли приведет к аддитивности, что, собственно, и выяснил автор.

А вот множественные замены, затрагивающие одновременно оба исследуемых района, напротив, представляются весьма перспективными, поскольку очевидно, что изменение свойств фермента при мутации в каждом из довольно отдаленных фрагментов имеет свой механизм, и эти механизмы вполне могут оказаться аддитивными. Что именно так и произошло, и самым блестящим результатом оказался мутант M8, в котором температурная стабильность повысилась более чем на порядок.

Таким образом, автором проведена очень объемная работа, нацеленная в конечном итоге на улучшение свойств и расширение возможностей применения фермента TvDAAO. Некоторые из полученных мутантов (в первую очередь M8) совершенно очевидно будут иметь, причем в самом ближайшем будущем, практическое применение в медицине и биотехнологии.

Что касается недостатков работы - часть из них уже была упомянута ранее - в ряде случаев решения автора по выбору кандидатов в мутанты кажутся спорными, эксперимент описан излишне подробно (включая протоколы производителей). Относительно стандартного замечания, касающегося опечаток и неудачных выражений - можно сказать следующее: запредельный объем работы в данном случае пошел автору на пользу: разумеется, в диссертации находятся и формальные ошибки и опечатки - но в таком массиве текста они теряются. Обращать внимание на неудачную фразу,

когда она скрывается в объеме в 250 страниц, довольно сложно. Хотя фраза "отличия, которые могут обеспечивают различную субстратную специфичность" - указывает на недостаточное внимание автора к вычитыванию текста, тем более что эта фраза взята из автореферата (стр.4), где, в отличие от огромного объема диссертации, она "не потерялась".

Подводя итоги, можно сказать, что выводы работы в целом соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Диссертационная работа ГОЛУБЕВА И.В. полностью соответствует требованиям к кандидатским диссертациям, изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» (№ 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор безусловно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Д.х.н.

ТУНИЦКАЯ В.Л.

Ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии
наук (ИМБ РАН)

Москва 119991, ул. Вавилова, д. 32.

Тел. (499)135-05-90

Ve_tun@mail.ru

