

## Отзыв официального оппонента о диссертации

Виктора Андреевича Анашкина

«Бактериальная пирофосфатаза, содержащая нуклеотид-связывающие CBS-домены:

кинетика и термодинамика катализа и регуляции»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия».

Неорганический пирофосфат участвует во многих реакциях в живой клетке. Поэтому изучение механизмов регуляции неорганических пирофосфатаз (PPаз) является важной задачей биоорганической химии. Актуальность диссертационной работы В.А. Анашкина определяется ее целью – работа посвящена исследованию механизма регуляции PPазы семейства II, содержащей нуклеотид-связывающие домены (CBS-PPазы). Для PPаз этого семейства механизм регуляции практически не исследован.

Результаты работы изложены и обсуждены в четырех разделах, каждый из которых содержит большой объем экспериментов, тщательно продуманных и выполненных и всесторонне проанализированных. В них описаны и обсуждены новые результаты, существенные для понимания механизмов действия и регуляции PPаз, принадлежащих к семейству II.

В первом разделе «Четвертичная структура CBS-PPазы и её значение для активности» для шести ферментов из пяти источников получены следующие новые данные:

1) CBS-PPаза является гомодимерным ферментом; 2) фермент активен именно в виде димера; 3) для двух бактериальных CBS-PPаз определены константы диссоциации и скоростей равновесия димер – мономер; 4) установлен факт влияния на равновесие лигандами регуляторного и активного центров – производными аденозина и ионами переходных металлов соответственно; 5) последний факт позволил рассчитать олигомерное состояние фермента в клетке.

В следующем разделе «Кооперативность в катализе и регуляции CBS-PPазы» исследовалась кооперативность катализа гидролиза пирофосфата, влияние на нее наличия регуляторной вставки в молекуле фермента и влияние на кооперативность производных аденозина. Для CBS-PPазы из *Desulfitobacterium hafniense* установлен положительный кооперативный механизм и определены величины макроскопических констант Михаэлиса ( $K_{m1}$  и  $K_{m2}$ , рис. 33, таблица 4) для двух активных центров. Этот результат был показан и для фермента из трех других источников. Для варианта *D. hafniense* CBS-PPазы, не содержащей регуляторного участка, было обнаружено отсутствие кооперативности. Положительный кооперативный эффект установлен для связывания



аденозинолигофосфатов с четырьмя CBS-PPазами. Для них было показано, что положительная кооперативность связывания зависит от концентрации ионов магния. Помимо новых данных о кинетическом механизме действия CBS-PPаз, описанных в этом разделе, найденные при этом различия в связывании фосфатов аденозина и ионов магния для фермента из четырех бактериальных источников вносят вклад в понимание тонких закономерностей структура - функция в PPазах семейства II. Зависимость кинетической кооперативности четырех ферментов от концентрации ионов магния (рис. 33, табл. 4) выявила интересные различия для этих ферментов, что может быть важно для понимания функционирования этих ферментов в физиологических условиях.

В разделе «Диаденозинполифосфаты как регуляторы CBS-PPазы» исследовано влияние диаденозинполифосфатов ( $Ar_nA$ ), содержащих 3–6 фосфорных фрагмента на активность нескольких CBS-PPаз. Следует подчеркнуть, что феномен влияния полифосфатных эфиров диаденозина на пирофосфатазы был обнаружен В.А. Анашкиным. Автором определены кинетические параметры активации ферментов четырьмя диаденозинполифосфатами ( $n = 3-6$ ) в зависимости от концентрации субстрата, ионов магния и концентраций полифосфатов. Для трех CBS-PPаз, содержащих регуляторный DRTGG-домен, найдено отсутствие кооперативности связывания при  $n > 3$  и «хорошая» активация полифосфатами – при наномолярных концентрациях. Эти ферменты проявили различную чувствительность к влиянию ионов магния на активацию под действием диаденозинполифосфатов и различную зависимость их влияния на активность при вариации концентраций субстрата. Весьма интересным и существенным для понимания особенностей регуляции CBS-PPаз следует считать обнаружение отсутствия влияния диаденозинполифосфатов на пирофосфатазы из *Eggerthella lenta* и *Moorella thermoacetica*, не содержащих дополнительный DRTGG-домен. Для исследования термодинамических параметров и стехиометрии связывания лигандов регуляторного центра с четырьмя PPазами был использован метод изотермической калориметрии. Установлено, что все  $Ar_nA$ , за исключением  $Ar_3A$ , связывались некооперативно со стехиометрией 1:1 в расчете на димерный белок; стехиометрия связывания  $Ar_3A$  и адениновых мононуклеотидов составляла 2:1. Важным фактом в этой части работы (таблица 13) следует считать установление необходимости домена DRTGG в структуре ферментов для активации диаденозинполифосфатами.

В разделе «Роль остатка аспарагина в передаче информации между каталитическими и регуляторными центрами» исследованы мутантные формы пирофосфатаз из *D. hafniense* и *Ethanoligenens harbinense*, последняя не содержит DRTGG-домен и для нее В.А. Анашкиным в этой работе было показано отсутствие кинетической кооперативности.



Мутантные формы с заменами остатков в каталитическом доменах РРазы из *D. hafniense* (замена N/S) и фермента из *E. harbinense* (замена S/N) были выбраны путем анализа генов РРаз в двух базах данных и получены методом сайт-направленного мутагенеза. Исследования кинетической кооперативности РРазы дикого типа из *E. harbinense* и мутантной формы показали, что замена серина 213 *E. harbinense* на аспарагин приводит к отсутствовавшей у фермента дикого типа отрицательной кооперативности. Для мутантной формы РРазы из *D. hafniense*, содержащей «зеркальную» замену аспарагина на серин, обнаружено отсутствие кинетической кооперативности и обратный по сравнению с ферментом дикого типа эффект Ар<sub>n</sub>А на кооперативность. Эти факты показали важность остатка аспарагина каталитического домена для CBS-РРаз. Структурные особенности, обеспечивающие необходимость этого остатка для CBS-РРаз, были анализированы, используя пространственную структуру гомолога CBS-РРазы – РРазы семейства II из *Bacillus subtilis*. Молекулярно-динамическое моделирование и сравнение структур фермента без регуляторной вставки и мутантной формы с заменой N77S показало, что замена N на S вызывает относительное смещение каталитических ДНН-доменов и ослабляет межсубъединичный контакт. Тем самым было установлено участие остатка аспарагина в формировании четвертичной структуры молекул РРаз и передаче информации между активными центрами двух мономеров в димере пироглюкоксидазы.

Работа В.А. Анашкина убедительно демонстрирует его высокий теоретический и экспериментальный уровни, она выполнена с привлечением большого, разнообразного набора современных методов физико-химической биологии и вносит существенный вклад в понимание механизмов действия РРаз семейства II. Об этом свидетельствует и публикация данных диссертации в высокорейтинговых журналах.

Экспериментальную часть диссертации предваряет обзор литературы, непосредственно связанный с темой работы. В этом разделе и во всех остальных цитируются 96 работ, в том числе опубликованные в 2016 году.

Диссертация написана хорошим, грамотным языком и практически не содержит англицизмов и опечаток. Работа очень хорошо оформлена. Автореферат также хорошо оформлен и полностью отражает содержание диссертации.

Небольшие замечания:

- 1) рекомендую в дальнейшем в работах в области энзимологии указывать квалификационные номера ферментов – объектов исследования;
- 2) в работе не дано собственное определение удельной активности, на стр. 59 приводится цифра «400 с<sup>-1</sup>» - это, вероятно, величина  $k_{кат}$ ;



- 3) слово «мутация» применимо для форм белков, возникших в природе, иногда оно используется вместо «мутантной формы», что следует использовать для «рукотворных» форм белков/ферментов;
- 4) на стр. 85 в таблице приводятся определенные методом изотермической калориметрии константы связывания лигандов (фосфатов аденозина и полифосфатов диаденозина) с CBS-PPазами, равные  $8 - 1 \times 10^{-7}$  М, далее пишется, что «диаденозинполифосфаты связываются с наномолярным средством...» - это высокое, но микромолярное средство.

Диссертация по актуальности темы, достоверности, уровню и значимости полученных результатов, обоснованности выводов полностью соответствует требованиям к диссертациям, представляемым на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертация В.А. Анашкина «Бактериальная пиррофосфатаза, содержащая нуклеотид-связывающие CBS-домены: кинетика и термодинамика катализа и регуляции» является полноценной научно-квалификационной и ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени «кандидат химических наук» по специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия».

Доктор химических наук, профессор,  
главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией  
химических основ биокатализа Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института молекулярной  
биологии имени В.А. Энгельгардта РАН,

(Т.В. Демидкина).

«*с/*» февраля 2017 г.

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН  
Тел.: 8(499)135-23-11, e-mail: [tvd@eimb.ru](mailto:tvd@eimb.ru)

