

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
Анашкина Виктора Андреевича
«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**

Диссертационная работа Анашкина В.А. посвящена изучению молекулярных механизмов регуляции целой группы бактериальных нуклеотид-связывающих пирофосфатаз. В исследование были включены 5 ферментов, содержащих CBS-домены, которые были обнаружены впервые в белке цистатионин-бета синтаза, что определило их название. Для этого фермента была выявлена кооперативность связывания с лигандами регуляторных CBS-доменов. В данной диссертации впервые изучены регуляторные функции CBS-доменов для CBS-пирофосфатаз. Интерес к CBS-белкам, которые включают растворимые белки и белки мембранных каналов, связан также с тем, что мутации в их CBS-доменах приводят к ряду наследственных заболеваний человека (например, синдром Бартера, гомоцистинурия и др.). Следует указать, что все CBS-пирофосфатазы обнаружены исключительно в патогенных микроорганизмах. Эти сведения указывают на актуальность работы.

Целью данной работы было установление молекулярных механизмов регуляции группы растворимых CBS-пирофосфатаз, выделенных из 5 видов бактерий. Стоит сразу отметить, что автору работы удалось получить действительно интересные и абсолютно приоритетные результаты, которые важны для понимания как самих пирофосфатаз, так и других CBS-белков.

Диссертация Анашкина В.А. изложена на 120 страницах и включает в себя следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, заключение с выводами, приложение и список литературы, содержащий 96 ссылок.

Обзор литературы посвящен описанию структур и функций большой группы CBS-белков, в том числе представлена информация и о самих CBS-пирофосфатазах. Обзор подводит к рассмотрению собственных результатов диссертанта. Автор наглядно показывает, что CBS-домены представлены как в растворимых, так и в мембранных белках. Самодостаточность CBS-доменов для образования устойчивой пространственной структуры показана на примере растительных белков семейства CBSX. Обсуждается также наличие канонических и неканонических сайтов связывания лигандов. Следует отметить, что восприятие сложного материала обзора облегчают представленные диссертантом 27 рисунков, отражающих варианты пространственной структуры CBS-белков. Литературные

данные показывают, что, несмотря на значительный объем накопленной информации, молекулярный механизм регуляции CBS-белков остается практически неизученным. Например, данные о кооперативных взаимодействиях выявлены только для двух белков - цистатионин-бета синтазы и инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы. В целом, обзор является несомненной удачей автора работы и будет полезен широкому кругу исследователей, работающих в данной области. Обзор может быть опубликован в одном из отечественных академических журналов или за рубежом.

В экспериментальной части подробно описаны использованные в работе материалы и экспериментальные подходы. Следует отметить комплексность исследования и высокий методический уровень работы. Применены современные методы молекулярной биологии и микробиологии, включая направленный мутагенез, а также широкий спектр физико-химических методов: от ферментативной кинетики и термодинамики регуляции до анализа структур белков методами молекулярной динамики. Поскольку пирофосфатазам для катализа необходимы ионы магния, образующие комплексы с субстратом и нуклеотидами, в экспериментальной части приведены константы диссоциации соответствующих комплексов. Это позволило использовать в качестве независимых переменных концентрации реальных реагирующих частиц, какими являются комплекс Mg-пирофосфат, свободный ион магния, свободный адениновый нуклеотид и вывести детальные кинетические схемы. В целом, раздел содержит практически всю необходимую информацию для понимания и, при необходимости, воспроизведения эксперимента.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из четырех частей, которые посвящены изучению различных свойств в общей сложности восьми CBS-пирофосфатаз из пяти грамположительных бактерий (пять ферментов диких штаммов и три генетически-модифицированных мутантных варианта). В первой части этой главы проведено исследование субъединичной структуры этих белков и впервые установлено, что данные ферменты являются димерными белками, состоящими из двух субъединиц.

Вторая часть этой главы посвящена кинетическому анализу явления кооперативности в катализе и регуляции фермента. В частности, автором впервые показан многоуровневый кооперативный механизм регуляции CBS-пирофосфатаз. Установлена положительная кинетическая кооперативность: связывание субстрата в одном активном центре облегчает его связывание в другом; степень кооперативности зависит от концентрации ионов магния. Положительная кооперативность проявляется также в связывании аденозинолигофосфатов в присутствии и в отсутствии субстрата. Эти результаты указывают на регуляторную роль взаимодействий трех типов: между активными центрами, между

регуляторными центрами, а также между регуляторным центром и активным центром.

В третьей части главы «Результаты и их обсуждение» исследован новый класс активаторов CBS-пирофосфатаз — диаденозинполифосфаты (Ar_nA , $n > 2$). Они обладают крайне высоким сродством к CBS-пирофосфатазам, и, кроме того, устраняют оба типа кооперативности ($n > 3$). Этот эффект объяснен связыванием диаденозинполифосфатов по двум регуляторным центрам, что приводит к ослаблению контакта между активными центрами. При этом фермент становится аллостерически нерегулируемым, но каталитически более активным (ниже константа Михаэлиса и выше кинетическая константа). Таким образом, можно предположить, что аллостерическая регуляция направлена на поддержание фермента в менее активной форме до поступления неких сигналов, например, увеличения внутриклеточной концентрации диаденозинполифосфатов.

С другой стороны, описанные эффекты диаденозинполифосфатов проявлялись лишь у CBS-пирофосфатаз, имеющих в своем составе помимо пары CBS-доменов дополнительный DRTGG-домен. На этом основании диссертантом предположено, что DRTGG-домен увеличивает гибкость регуляторной части, что позволяет разместить более объемные молекулы диаденозинполифосфатов по сравнению с аденозинолигофосфатами.

Диаденозинполифосфаты относят к так называемым «алармонам» — соединениям, появляющимся при клеточном стрессе, и их участие в нем может быть опосредовано их воздействием на CBS-пирофосфатазы, как предположено диссертантом.

В заключительной части работы идентифицирован остаток аспарагина консервативного мотива DHNE каталитической части CBS-пирофосфатаз, существенный для проявления кооперативности. Замена аспарагина на серин методом направленного мутагенеза приводит к потере кооперативности, указывая на роль аспарагина в контакте между активными центрами. Однако, в присутствии диаденозинтетрафосфата диссертант наблюдал возврат кинетической кооперативности.

В этой же заключительной части работы методом молекулярной динамики проведено моделирование образующихся структур при виртуальной замене аспарагина на серин в гомологе CBS-пирофосфатазы, содержащем только каталитические домены. Эта виртуальная замена приводит к разрушению сети водородных связей между активными центрами димера, что может служить объяснением устранения кинетической кооперативности в реальном случае.

Рукопись диссертации представляет собой целостный и обдуманый труд, все разделы которого хорошо сбалансированы и логически связаны. Текст работы прекрасно иллюстрирован — всего в основной части рукописи имеется 52 рисунка, 17 таблиц, 4 схемы и 9 уравнений, которые дополнены приложением, содержащим

ещё 3 рисунка, 2 схемы и 5 уравнений. Работа написана хорошим языком и практически лишена опечаток.

Замечаний по содержанию и изложению работы не выявлено.

Однако остаётся непонятным и вызывает вопрос, с чем связан возврат кооперативности при виртуальной замене аспарагина на серин в присутствии диаденозинполифосфатов.

В качестве формального замечания, можно отметить недостаточно полный список сокращений и отсутствие некоторых специфичных для данной работы сокращений, как IMPDH (инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа), SAM (S-аденозин-метионин) и др.

Данное замечание не затрагивает основного содержания представленной диссертации и не влияет на ее общую положительную оценку. А возникновение новых вопросов, напротив, усиливают работу и показывают перспективность развития этого исследования.

Диссертационная работа Анашкина В.А. представляет новаторское и комплексное исследование, выполненное на высочайшем научно-методическом уровне. Степень новизны и научной значимости результатов Анашкина В.А. соответствует работам мирового уровня, что подтверждается также публикациями в высоко-рейтинговых журналах. Основные результаты диссертационной работы Анашкина В.А. опубликованы в трех статьях в рецензируемых высоко-рейтинговых журналах *Journal of Biological Chemistry* и *Biochemical Journal* (импакт фактор *Web of Science* в интервале 4,5-5,0) и достоверность результатов не вызывает сомнений. Выводы полностью соответствуют полученным в работе результатам. Автореферат и публикации полностью отражают основное содержание и выводы работы.

Научные результаты диссертации, а также методические подходы могут быть в дальнейшем использованы для выполнения фундаментальных исследований в области регуляции биологической активности белков в высших учебных заведениях и научно-исследовательских организациях, специализирующихся в области биоорганической химии и молекулярной биологии, включая Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт биологии гена РАН и другие научные учреждения. Результаты работы Анашкина В.А. потенциально могут также иметь прикладное значение и использоваться в биотехнологии для создания новых антибактериальных препаратов.

В целом, диссертационная работа Анашкина Виктора Андреевича «Бактериальная пирофосфатаза, содержащая нуклеотид-связывающие CBS-домены: кинетика и термодинамика катализа и регуляции» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ в редакции постановления Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., и является научно-квалификационной работой, в которой детально исследованы структурно-функциональные свойства CBS-пирофосфатаз и впервые показан кооперативный механизм регуляции этих белков. Решение данной задачи вносит весомый вклад в понимание фундаментальных механизмов регуляции как CBS-пирофосфатаз, так и других CBS-белков и имеет большое значение для развития исследований в этой области биоорганической химии. Анашкин Виктор Андреевич, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Заведующий лабораторией патогеномики и транскриптомики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии
(ФГБНУ «НИИОПП»)

Доктор биологических наук, профессор

Шифр специальности : 03-01-03 – «Молекулярная биология»

 Брага Э.А.

Адрес: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

Рабочий телефон: +7-(499)-151-17-56

Адрес электронной почты (e-mail): eleonora10_45@mail.ru

08 февраля 2017 г.

Подпись д.б.н. профессора Брага Э.А.

ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ФГБНУ «НИИОПП»

кандидат медицинских наук





Скуратовская Л.Н.