

Федеральное государственное учреждение  
**«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»**

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

02.02.2019 № 12707-1771-66

На № \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора  
Федерального исследовательского центра  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук, д.х.н., профессор

 Б.Б. Дзантиев

« 2 » февраля 2017 года



**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»  
на диссертационную работу **АНАШКИНА Виктора Андреевича**  
**«Бактериальная пирофосфатаза, содержащая нуклеотид-связывающие CBS-домены:  
кинетику и термодинамику катализа и регуляции»,**  
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по  
специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Нуклеотид-связывающие CBS-домены были открыты в белках Бейтманом в 1997 году и к настоящему моменту обнаружены во множестве организмов. Так, у человека есть 75 белков, содержащих CBS-домены (CBS-белков), а у бактерии *Escherichia coli* – 8. Интерес к CBS-доменам связан с тем, что они способны связывать адениновые нуклеотиды и таким образом регулировать функции содержащих их белков. Кроме того, ряд наследственных заболеваний человека, таких как гомоцистинурия, пигментозный ретинит, синдром Бартера, остеопетроз, связан с мутациями в CBS-доменах растворимых белков и мембранных каналов. Однако, несмотря на то, что пространственная структура определена (полностью и частично) для нескольких CBS-белков, механизм их регуляции остается практически неизвестным.

Диссертационная работа Анашкина В.А. направлена на изучение механизма регуляции особой разновидности неорганической пирофосфатазы, которая содержит CBS-домены (CBS-PPаза). Это типичный CBS-белок, который может служить моделью других CBS-белков. Пирофосфатазы, в том числе CBS-PPазы, катализируют одну из важнейших реакций любой клетки — превращение пирофосфата в фосфат. Как известно, пирофосфат является метаболитом многих биосинтетических процессов, а его гидролиз приводит к сдвигу этих процессов в сторону синтеза. Регуляция активности пирофосфатазы, а, следовательно, уровня пирофосфата в клетках является, таким образом, важным элементом регуляции биосинтетических процессов.

Исследования в данной области относятся к приоритетному направлению развития научно-технологического комплекса России «Живые системы», а также к критическим технологиям «Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии» и «Технологии биоинженерии», поэтому актуальность представленной работы не вызывает сомнений.

Работа изложена на 120 страницах, содержит 17 таблиц, 52 рисунка, 4 схемы, 9 уравнений и 3 приложения общим объемом 5 страниц, список литературы включает 96 цитированных работ. Основные результаты работы представлены и апробированы на 1 научной конференции и опубликованы в виде 3 статей в рецензируемых журналах. Автореферат включает основные положения, выносимые на защиту.

Диссертация Анашкина В.А. построена традиционным образом и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения с основными выводами, приложения и списка цитированной литературы.

Во введении описана фундаментальная проблема, которой посвящена диссертационная работа, обоснованы актуальность и новизна исследований, сформулированы цель работы и решаемые задачи.

В обзоре литературы «Белки, содержащие CBS-домены» (глава 2) суммированы данные о CBS-белках с известной структурой, описаны их функции. Также представлена информация о канонических и неканонических сайтах связывания лигандов в CBS-доменах. Удивительно, что CBS-домены могут не только быть составной частью сложного белка, как показано на примере шести CBS-белков, но также образовывать самостоятельные функциональные структуры, что показано на примере белков семейства CBSX. Из обзора литературы следует, что, несмотря на большой объем накопленной информации, механизм регуляции CBS-доменами в различных CBS-белках остается малопонятным. Обзор литературы написан грамотно, изложен в классическом академическом стиле и хорошо иллюстрирован, что значительно облегчает восприятие рассмотренных автором вопросов. Особенно хочется отметить важность собранного и

систематизированного диссертантом материала о белках, содержащих CBS-домены. Ввиду того, что данные, приведенные в обзоре, представляют интерес для широкого круга исследователей, хорошо систематизированы и изложены, можно рекомендовать автору диссертации опубликовать этот материал в виде отдельного обзора в научном журнале.

Глава 3 содержит описание использованных методов и подходов. Приведенные в ней экспериментальные протоколы описаны детально, так что могут стать настольным пособием для желающего применить их в своих исследованиях. Это является несомненным достоинством работы. Обилие использованных в работе методических подходов — от методик клонирования и выделения CBS-PPаз, анализа различных физико-химических свойств объектов исследования до методик подготовки и постановки молекулярно-динамического эксперимента — все это позволяет говорить о высоком методическом уровне работы и высокой квалификации соискателя.

В главе 4 приведены результаты изучения диссертантом свойств CBS-PPаз из пяти грамположительных бактерий: 1) анализа четвертичной структуры и ее значения для активности CBS-PPаз; 2) анализа кооперативности в катализе и регуляции; 3) определения диаденозинполифосфатов как существенных регуляторов CBS-PPаз; 4) идентификации остатка аспарагина как ключевого элемента в передаче информации между каталитическими и регуляторными центрами CBS-PPаз. В частности, автором впервые показано, что CBS-PPаза представляет собой гомодимер, который диссоциирует на неактивные субъединицы при разбавлении. Установлен кооперативный механизм регуляции CBS-PPазы, имеющий два аспекта: кооперативное связывание субстрата (пирофосфата) и кооперативное связывание лигандов регуляторного центра (аденозинолигофосфатов). Положительный знак кооперативности в обоих случаях усиливает зависимость активности фермента от концентрации субстрата и регулирующих нуклеотидов. Анашкиным В.А. был выявлен отдельный класс регуляторов CBS-PPаз, содержащих дополнительный DRTGG-домен, — диаденозинполифосфаты. Эти соединения увеличивают активность в несколько раз, имеют крайне высокое сродство к таким CBS-PPазам и устраняют оба типа кооперативности в них. Автором идентифицирован остаток аспарагина в каталитической части фермента, необходимый для проявления кооперативности. Следует отметить системный подход, использованный диссертантом и позволивший получить данные о различных свойствах CBS-PPаз, которые существенно расширяют имеющиеся знания о механизмах регуляции CBS-белков.

Работа представляет собой систематическое, вполне законченное исследование, выполненное автором в коллективе с различными специалистами. Материал диссертации изложен последовательно, ясно и логично. Использованные в работе экспериментальные методы обоснованы и приняты в практике научных исследований. Результаты опытов достоверны, научные положения и сформулированные выводы, изложенные в

диссертации, вытекают из экспериментальных данных. В рамках общих требований к оформлению диссертации приятно отметить, что диссертация написана грамотным научным языком, хорошо оформлена и практически не имеет опечаток или неудачных выражений.

По представленной диссертационной работе необходимо сделать несколько замечаний:

- Зависимость удельной ферментативной активности CBS-пирофосфатазы от концентрации белка в состоянии равновесия (рис. 32) описана с помощью уравнения, которое было впервые предложено Б.И.Кургановым (Б.И.Курганов «Кинетический метод расчета констант ассоциации белковых молекул», Молекулярная биология 1967, том 1, вып. 1, с. 17-27). Ссылка на эту работу была бы вполне уместной.

- Для описания зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и модификаторов для димерных пирофосфатаз использованы уравнения, содержащие макроскопические константы диссоциации. Очевидно, что более удобным было бы использование микроскопических констант диссоциации, поскольку в этом случае возможно прямое сопоставление констант диссоциации для связывания лиганда в первом и втором лиганд-связывающем центре без учета статистических множителей.

- Для описания зависимостей скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и модификаторов использовано эмпирическое уравнение Хилла, которое помимо коэффициента Хилла содержит еще один параметр – концентрацию полунасыщения для лиганда. Значения этого параметра следовало бы для полноты картины представлять наряду с коэффициентом Хилла.

Перечисленные замечания не являются принципиальными, носят скорее рекомендательный характер и не ставят под сомнение основные результаты, фундаментальную и практическую значимость работы.

Содержание материалов диссертационной работы достаточно полно отражено в публикациях Анашкина В.А. Выводы обоснованы и хорошо проиллюстрированы материалами автореферата. Автореферат отражает основное содержание диссертации. В целом, диссертационная работа Анашкина В.А. представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение важной фундаментальной задачи, связанной с функционированием нуклеотид-регулируемых пирофосфатаз и их роли в регуляции биосинтетических процессов. Полученные данные представляют интерес для исследований, связанных с изучением клеточного стресса, биоэнергетики и биокатализа, а также изучением механизмов регуляции активности ферментов у про- и эукариот, которые проводятся в институтах академического профиля – Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте молекулярной биологии



### Сведения о ведущей организации

по диссертационной работе Анашкина Виктора Андреевича «Бактериальная пирофосфатаза, содержащая нуклеотид-связывающие CBS-домены: кинетика и термодинамика катализа и регуляции», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ФИЦ биотехнологии РАН
Почтовый индекс, адрес организации	119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Веб-сайт	www.fbras.ru
Телефон/факс	(495) 954-52-83; Факс: (495) 954-27-32
Адрес электронной почты	info@fbras.ru
ФИО, ученая степень, ученое звание руководителя организации	Попов Владимир Олегович, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, директор ФИЦ биотехнологии РАН
ФИО, ученая степень, ученое звание, должность сотрудника, составившего отзыв ведущей организации	Борис Иванович Курганов, доктор химических наук, профессор (по специальности 02.00.15 – кинетика и катализ), главный научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха в составе ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Ведущая организация подтверждает, что соискатель не является ее сотрудником и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе ведущей организации или в соавторстве с ее сотрудниками.

### Список основных публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет

1. Trofimov A.A., Polyakov K.M., Lazarenko V.A., Popov A.N., Tikhonova T.V., Tikhonov A.V., Popov V.O. (2015) "Structural study of the X-ray induced enzymatic reaction of octaheme cytochrome c nitrite reductase". Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. v. 71, № 5, p. 1087-1094.
2. Boyko K., Gorbacheva M., Rakitina T., Korzhenevskiy D., Vanyushkina A., Kamashev D., Lipkin A. and Popov V. (2015) "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the histone-like HU protein from Spiroplasma melliferum KC3". Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. v. 71, p. 24–27.

3. Osipov E.M., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Kittl R., Dorovatovskii P.V., Shleev S. V., Popov V.O. and Ludwig R. (2015) "Incorporation of copper ions into crystals of T2 copper-depleted laccase from *Botrytis aclada*". *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*. v. 71, N 12 p. 1465–1469.
4. Slutskaia E., Artemova N., Kleymenov S., Petrova T., Popov V. (2015) Heat-induced conformational changes of TET peptidase from crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis*. *European Biophysics Journal*. v., 44, N8, p. 667-675.
5. Borzova V.A., Markossian K.A., Kara D.A., Kurganov B.I. (2015) "Kinetic regime of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin". *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 80, p. 130-138.
6. Chebotareva N.A., Eronina T.B., Roman S.G., Poliansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B.I. "Effect of crowding and chaperones on self-association, aggregation and reconstitution of apophosphorylase b". *Int. J. Biol. Macromol.* 2013 v. 60, p. 69-76.
7. Borzova V.A., Markossian K.A., Kara D.A., Chebotareva N.A., Makeeva V.F., Poliansky N.B., Muranov K.O., and Kurganov B.I. "Quantification of anti-aggregation activity: a test-system based on dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin". *PLoS One*, 2013, 8(9):e74367.
8. Eronina T.B., Chebotareva N.A., Sluchanko N.N., Mikhaylova V.V., Makeeva V.F., Roman S.G., Kleymenov S.Y., Kurganov B.I. "Dual effect of arginine on aggregation of phosphorylase kinase". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, v. 68, p. 225–232.
9. Chebotareva N.A., Filippov D.O., Kurganov B.I. "Effect of crowding on several stages of protein aggregation in test systems in the presence of alpha-crystallin". *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, v. 80, p. 358-365
10. Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Chebotareva N.A., Kurganov B.I. "Kinetic regime of thermal aggregation of holo- and apoglycogen phosphorylases b". *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, v. 92, p. 1252-1257.
11. Borzova V.A., Markossian K.A., Chebotareva N.A., Kleymenov S.Y., Poliansky N.B., Muranov K.O., Stein-Margolina V.A., Shubin V.V., Markov D.I., Kurganov B.I. "Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin". *PLoS One*, 2016, 11(4):e0153495.
12. Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Chebotareva N.A., Makeeva V.F., Kurganov B.I. "Checking for reversibility of aggregation of UV-irradiated glycogen phosphorylase b under crowding conditions". *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, v. 86, p. 829-839.

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН  
кандидат биологических наук

*АФ*

А.Ф. Орловский

