

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Шеломова Михаила Дмитриевича на тему: «Оксидазы D-аминокислот из дрожжей: получение и структурно-функциональные исследования» по специальностям 1.5.4 – Биохимия и 1.5.6. – Биотехнология

Диссертационная работа М. Д. Шеломова, представленная на защиту, посвящена интересной проблеме ферментативной биотехнологии - поиску, получению в рекомбинантной форме, характеристике и модификации оксидаз D-аминокислот. Ферменты этого типа (DAAO, КФ 1.4.3.3.) играют важную роль в различных биохимических процессах живых организмов и активно используются в практической биотехнологии.

Вместе с тем у известных DAAO имеются проблемы субстратной специфичности и активности, вариабельной температурной и химической стабильности. Для решения этих сложностей существует ряд экспериментальных подходов – поиск и получение рекомбинантных ферментов из различных организмов, совершенствованием методов их выделения и очистки, а также получение мутантных форм с улучшенными свойствами. Диссертант в своей работе обращается ко всем перечисленным стратегиям. М.Д. Шеломовым были поставлены задачи разработки методов поиска оксидаз D-аминокислот по геномным данным и предсказание их субстратной специфичности; получения новых DAAO из дрожжей *Ogataea parapolymorpha*; получение мутантов DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis* с повышенной активностью и стабильностью. Представленную диссертационную работу можно отнести к перспективным направлениям научного и технологического поиска. Проведенное исследование имеет очевидную научную новизну, фундаментальную и практическую значимость.

Исследование имеет обоснованный экспериментальный план, разделенный на логичные этапы, необходимые для достижения конечного результата. В работе были использованы разнообразные современные

научные методы – биоинформационный поиск и молекулярное моделирование, генетическое клонирование, белковая инженерия, спектрофотометрическое определение энзимологических параметров, жидкостная хроматография. Особого внимания заслуживает комбинирование предсказания функций ферментов по аминокислотным последовательностям с пространственным моделированием тримерной структуры гипотетических белков с помощью пайплайнов AlphaFold и RosettaFold. Совокупность полученных экспериментальных результатов позволяет оценить работу М. Д. Шеломова как самостоятельный законченный научный труд с обоснованными выводами.

Диссертация М. Д. Шеломова построена по традиционному плану. Она включает введение, обзор литературы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список использованных литературных источников (131 ссылка). Материал диссертации изложен на 132 страницах текста и иллюстрирован 32 таблицами и 34 рисунками.

В разделах «Введение» и «Обзор литературы» автор даёт обоснование цели исследований, определяет задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы представлены общие сведения об известных оксидазах D-аминокислот из различных организмов, разнообразии их биологической роли, известных и потенциальных приложениях в биотехнологии, структуре и механизме действия, в том числе и в контексте каталитических свойств и стабильности. Особого интереса привлекает систематизация данных и сведение их в таблицы для наглядного сравнения. Этот раздел требовал отдельных усилий, принимая во внимание разнообразие используемых в различных лабораториях мира методов определения активности и энзимологических параметров DAAO. Глава «Обзор литературы» представляет собой сделанное автором аналитическое исследование и имеет самостоятельную ценность. Обзор литературы отличается хорошей структурированностью, наглядно иллюстрирован, и даёт читателю достаточную информацию для оценки

предпосылок проведения диссертационного исследования и мирового экспериментального задела в этой области.

Описание проведенных диссертантом исследований приведено в разделе «Материалы и методы». Используемые методы микробиологии, биоинформатики, молекулярной биологии, белковой химии, энзимологии и физической химии приведены с детальностью, достаточной для независимого воспроизведения, причем некоторые методы, давно рутинные (выделение ПЦР-амплифицированной и плазмидной ДНК, трансформация хемокомпетентных клеток) даны излишне подробно.

Обсуждение результатов исследований М.Д. Шеломова представлено в соответствующем разделе. Каждый блок полученных результатов обоснован, наглядно представлен, анализ новых данных проведен в свете ранее известного материала. Обращает на себя внимание большое количество и наглядность иллюстраций. Основные результаты, полученные М. Д. Шеломовым полностью обоснованы и достоверны. Было проведено определение паралогичных генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот и D-аспаргатаксидазу в геноме дрожжей *Ogataea parapolyomorpha*, сконструированы векторы экспрессии клонированных генов, пять рекомбинантных белков были получены в растворимой и биологически активной форме, определен их олигомерного состава, субстратная специфичность и активность при различных значениях температуры и pH, осуществлен подбор оптимальных буферов для хранения белков. Построение модельных структур белков позволило определить аминокислотные остатки, участвующие в координации субстратов в активных центрах. Этот биоинформационно-структурный подход был применен к поиску генов DAAO в секвенированных геномах микроорганизмов. Были получены и охарактеризованы многоточечные мутантные DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis*, которые по своим свойствам превосходят ранее описанные версии и перспективны для

применения в биотехнологии. Три вывода работы полностью соответствуют поставленным в начале работы задачам, точно отражают содержание работы, и позволяют считать основную цель работы вполне достигнутой. По теме диссертации автором опубликованы 6 статей (в соавторстве) в рецензируемых международных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus. Апробация работы проведена в виде 16 устных и стендовых сообщений на международных и российских научных конференциях. Опубликованные материалы и автореферат диссертационной работы – М.Д. Шеломова «Оксидазы D-аминокислот из дрожжей: получение и структурно-функциональные исследования» полностью отражают содержание диссертации и научные положения, выносимые на защиту.

По результатам изучения текста диссертации можно высказать лишь несколько незначительных замечаний, например, использование термина «гомологи» не в эволюционном контексте, а в значении «сходство аминокислотных последовательностей белков» и использовании лабораторного жаргона, например, «катионообменник» вместо «катионообменная смола». Замечания не носят принципиального характера и не умаляют достоинств работы.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.4 – Биохимия и 1.5.6. – Биотехнология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шеломов Михаил Дмитриевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4 – Биохимия и 1.5.6. – Биотехнология.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, член-корреспондент РАН

Главный научный сотрудник

Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук

Мирошников Константин Анатольевич

Подпись

05 мая 2023 г.

Контактные данные:

Телефон +7 (499) 335-55-88, [REDACTED]

E-mail: kmi@ibch.ru

Специальности, по которым официальным оппонентом

защищена диссертация: 03.01.04 – «биохимия», 03.01.06 – «биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

Адрес места работы:

117991, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт

биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

Подпись Мирошникова К.А. заверяю:

Заместитель директора ИБХ РАН,

д.х.н., профессор РАН

Белогуров Алексей Анатольевич