

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д001.022.03,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 14.11.2019 № 29

О присуждении Боброву Кириллу Сергеевичу, гражданину
Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Рекомбинантная α -галактозидаза из
супертермофильной бактерии *Thermotoga maritima*: исследование
кинетических и структурных свойств»

по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

принята к защите 18.06.2019 года (протокол заседания № 21)
диссертационным советом

Д001.022.03, созданным на базе Федерального государственного
бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной
медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12
(утвержден Приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012).

Соискатель Бобров Кирилл Сергеевич, 1983 года рождения.

В 2006 году соискатель окончил «Санкт-Петербургский
государственный технологический институт (технический университет)»
по направлению «Биотехнология»,

работает младшим научным сотрудником в Федеральном государственном
бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» - ПИЯФ).

Диссертация выполнена в Лаборатории энзимологии Отделения
молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного
бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт».

Научный руководитель – кандидат биологических наук
Кульминская Анна Алексеевна, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», Отделение молекулярной и радиационной биофизики, лаборатория энзимологии, заведующая.

Официальные оппоненты:

Гончаров Николай Васильевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, лаборатория сравнительной биохимии ферментов, заведующий;

Туроверов Константин Константинович, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, лаборатория структурной динамики, стабильности и фолдинга белков, заведующий, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук г. Владивосток, известная передовыми исследованиями О-гликозидгидролаз различных морских организмов, в своем положительном заключении, подписанном ведущим научным сотрудником, доктором химических наук, доцентом Бакуниной Ириной Юрьевной, и утвержденном директором института кандидатом химических наук Дмитренко Павлом Сергеевичем указала, что представленная к защите диссертация представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, в которой установлена взаимосвязь строения, свойств и расположения в пространстве отдельных элементов белковой структуры и активного центра рекомбинантной α -галактозидазы и каталитических функций фермента, расширяющая фундаментальные знания о структурно-функциональных отношениях О-гликозидгидролаз 36 семейства.

Соискатель имеет 33 опубликованных работы, в том числе 13 по теме диссертации, из них в рецензируемых научных изданиях,

опубликовано 3 работы (общим объемом 1,0 условный печатный лист). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах. Наиболее значимые из них следующие:

1. Бобров К.С. Повышение эффективности реакции трансгликозилирования, катализируемой альфа-галактозидазой из *Thermotoga maritima*, методами белковой инженерии / К. С. Бобров, А. С. Борисова, Е. В. Энейская, Д. Р. Иванен, К. А. Шабалин, А. А. Кульминская, Г. Н. Рычков // Биохимия – 2013. – Т. 78 – № 10 – 1422–1435с. (авторский вклад 50%)
2. Borisova A.S. α -Galactobiosyl units: thermodynamics and kinetics of their formation by transglycosylations catalysed by the GH36 α -galactosidase from *Thermotoga maritima* / A. S. Borisova, D. R. Ivanen, K. S. Bobrov, E. V. Eneyskaya, G. N. Rychkov, M. Sandgren, A. A. Kulminskaya, M. L. Sinnott, K. A. Shabalin // Carbohydrate Research – 2015. – Т. 401 – 115–121с. (авторский вклад 40%)
3. Comfort D.A. Biochemical Analysis of *Thermotoga maritima* GH36 α -Galactosidase (*Tm* GalA) Confirms the Mechanistic Commonality of Clan GHD Glycoside Hydrolases † / D. A. Comfort, K. S. Bobrov, D. R. Ivanen, K. A. Shabalin, J. M. Harris, A. A. Kulminskaya, H. Brumer, R. M. Kelly // Biochemistry – 2007. – Т. 46 – № 11 – 3319–3330с. (авторский вклад 50%)

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

Бовина Николая Владимировича, доктора химических наук, профессора, заведующего лабораторией углеводов Отдела химической биологии гликанов и липидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Отзыв положительный, содержит замечание: «В выводе 3 приведены величины выходов изомерных дисахаридов — продуктов транс-гликозилирования. Но выходы зависят от конкретно примененных условий реакции, поэтому в разделе «Выводы» нужно приводить только относительные величины, да и то — сопроводив их комментарием об условиях, например, «в условиях максимально наблюдаемого общего выхода». В какой-то степени сказанное можно отнести и к Выводу 5. Кроме того, хотелось бы увидеть объяснение

факта резкого изменения специфичности фермента в пользу 1-2 -изомера при замене фенилаланина-328, а не ограничиваться простой констатацией этого факта»;

Копылова Павла Христофоровича, кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории чумы отдела особо опасных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации. Отзыв положительный, вопросов и замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается наличием публикаций в соответствующей сфере исследований, широкой известностью и достижениями в рассматриваемой области биологических наук.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны принципы исследования физико-химических характеристик рекомбинантной α -галактозидазы, а также роли ключевых аминокислотных остатков в реакциях гидролиза и синтеза, катализируемых данным ферментом;

предложены изменения первичной структуры рекомбинантной α -галактозидазы, приводящие к оптимизации выхода продуктов и региоселективности реакции трансгликозилирования;

доказана перспективность использования препаратов рекомбинантной α -галактозидазы в реакциях направленного синтеза галактозосодержащих соединений с высоким выходом;

введены новые представления о роли остатков аспарагиновой кислоты в положениях 327 и 387 в катализе, осуществляемом исследуемым ферментом.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: впервые доказана роль остатков аспарагиновой кислоты рекомбинантной α -галактозидазы в 327-м и 387-м положениях в ферментативной реакции, а также роль микроокружения активного центра, что расширяет

фундаментальные знания о структурах активного центра представителей 36 семейства гликозидгидролаз;
применительно к проблематике, которой посвящено диссертационное исследование, результативно использован комплекс методов ферментативной кинетики в сочетании с методами ЯМР-спектроскопии, молекулярно-генетическими методами и методами компьютерного моделирования;
изложены идеи по наличию дополнительной лимитирующей скорости стадии реакции гидролиза гликозидной связи, катализируемой рекомбинантной α -галактозидазой из *Thermotoga maritima*, предшествующей стадии расщепления первой связи и включающей в себя изменение конформации субстрата;
раскрыты возможности рекомбинантного фермента катализировать реакцию не только гидролиза, но и синтеза гликозидной связи;
изучены структурно-функциональные особенности рекомбинантной α -галактозидазы из *Thermotoga maritima*;
проведена модернизация ферментного препарата α -галактозидазы методом сайт-направленного мутагенеза с целью изменения его гидролитических и синтазных свойств.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:
разработаны и внедрены на исследовательском уровне методы синтеза галактосодержащих соединений с помощью ферментных препаратов α -галактозидазы из *Thermotoga maritima*;
определены кинетические параметры реакций гидролиза ряда хромофорных субстратов, катализируемого рекомбинантной α -галактозидазой из *Thermotoga maritima*, и выявлены аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в катализе, а также влияющие на общий выход продуктов и региоселективность реакции трансгликозилирования;
создана стратегия повышения эффективности синтеза *para*-нитрофенил- α -галактопиранозил - $\alpha(1,2)$ -галактопиранозида с использованием

модифицированной методом сайт-направленного мутагенеза рекомбинантной α -галактозидазы;

представлены рекомендации для создания эффективного инструмента направленного синтеза α -галактосодержащих соединений, а также показаны возможности создания рекомбинантных гликозидаз с перспективой их применения для терапии некоторых болезней накопления;

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты экспериментальных работ получены на современном сертифицированном оборудовании, с использованием методов, оптимально подобранных для решения поставленных задач, и обработаны адекватными статистическими приемами;

теория и идеи построены и базируются на известных проверяемых данных, сформулированных на основе тщательного анализа большого количества современной отечественной и зарубежной научной литературы по теме диссертационного исследования;

использован анализ собственных результатов диссертационного исследования и результатов, полученных другими группами ученых в данной области;

установлено соответствие механизма действия исследуемой α -галактозидазы из *Thermotoga maritima* с механизмом действия других известных гликозидгидролаз 36 семейства;

использованы современные биохимические и биофизические методы получения и характеристики продуктов, а также оценки эффективности реакций ферментативного синтеза галактосахаридов.

Личный вклад соискателя состоит в: участии в постановке цели и задач исследования; составлении плана экспериментов, их проведении и получении исходных данных; статистической обработке и интерпретации полученных данных; апробации результатов исследования на всероссийских и международных конференциях; подготовке публикаций по выполненной работе.

На заседании 14 ноября 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Боброву К.С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в

количестве 27 человек, из них 11 докторов наук по специальности 03.01.04 — Биохимия (6 докторов биологических наук и 5 докторов медицинских наук), участвовавших в заседании, из 35 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

за – 26, против – 1, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Васильев В. Б.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хныченко Л. К.

14 ноября 2019 г.