

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Бакуновой Алины Константиновны «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*: каталитические свойства и структура», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности

1.5.4. Биохимия

Актуальность темы

Исследование живых систем и последующее практическое применение знаний в синтетической химии основано на понимании свойств ферментов - природных катализаторов. Ферменты, зависящие от пиридоксаль-5'-фосфата (PLP), широко распространены в природе и играют ключевую роль в метаболизме. Среди них, PLP-зависимые трансаминазы успешно применяются в стереоселективном аминировании органических соединений. Одним из важных семейств PLP-зависимых ферментов является семейство трансаминаз D-аминокислот (DATA), которые играют ключевую роль в переносе аминогруппы между D-аминокислотами и α -кетокислотами.

Основные проблемы, рассмотренные в работе

В работе Бакуновой А.К. исследована новая трансаминаза D-аминокислот, с организацией активного центра отличающейся от ранее известных. В работе проведена структурно-функциональная характеристика рекомбинантной формы новой трансаминазы, описан активный центр, новый для этого типа ферментов. В исследовании также выявлены некоторые новые закономерности взаимосвязи структуры и функции у трансаминаз, предложены структурные факторы дополнительной активности с первичными (R)-аминами. Детально исследовано превращение субстратов – D-аминокислот в активном центре трансаминазы методом «остановленного потока». Также в работе определена роль остатков активного центра в связывании субстратов, координации кофактора и стабильности функционального димера.

Теоретическая и практическая значимость

Работу выгодно отличает сочетание комплексных методов исследования взаимосвязи структуры и функции. Это позволило охарактеризовать новый активный центр PLP-зависимой трансаминазы D-аминокислот из *H. hydroxysis*. Показана роль отдаленных от кофактора аминокислотных остатков в стабилизации его рабочей конформации. Продемонстрирована возможность применения трансаминазы из *H. hydroxysis* как биокатализатора синтеза разнообразных D-аминокислот с энантиомерным избытком более 99%. Также определены факторы, стабилизирующие PLP в активном центре, предложены подходы к стабилизации холофермента в реакционных условиях и к 100% реактивации холофермента. В ходе исследований были депонированы пять структур в банк данных белковых структур.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Бакуновой А.К. построена по стандартной схеме: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключение и список литературы, включающий 240 источников, работа изложена на 131 странице. Работа хорошо структурирована, разделы и подразделы логически связаны друг с другом. В работе поставлены 5 основных задач, по которым сформулированы 5 положений, выносимых на защиту.

В главе обзор литературы автор подробно проанализировала имеющиеся на сегодня сведения, касающиеся механизма ферментативного трансаминирования и деталей структурной организации трансаминаз. Обзор литературы включает молекулярные и исторические аспекты изучения пиридоксалевого катализа. В заключение обзора литературы освещено современное состояние промышленного биокатализа в контексте применения трансаминаз для синтеза первичных оптически активных аминов. Обзор литературы дает полное представление об изучаемой проблеме.

В главе материалы и методы исчерпывающе описаны методики исследования. Спектр использованных методов впечатляет и охватывает

генно-инженерные подходы для получения рекомбинантных ферментов и их мутантных вариантов, хроматографические методы, методы для анализа ферментативных реакций, кристаллизацию белков и рентгеноструктурный анализ.

В главе результаты и их обсуждения приведены результаты работы и их анализ на основе литературных данных. В этом разделе с большим количеством иллюстративного материала дана структурная и функциональная характеристика DАТА из бактерии *H. hydroxsis*, которая отличается от канонических DАТА организацией активного центра и обладает высокой каталитической константой. В работе проведен детальный анализ кинетики и структуры фермента. В продолжение структурных исследований в работе проанализированы функции боковых групп аргининов активного центра: рассмотрено их участие в связывании субстратов, стабилизации активной формы кофактора, в поддержании структурно функционального димера. В работе также исследованы особенности взаимодействия фермента с ингибитором D-цикloserином, выявлены пути к реактивации фермента. В завершающем разделе главы результаты и их обсуждения показана возможность эффективного применения трансминазы D-аминокислот в синтезе оптически чистых D-аминокислот с разной длиной бокового радикала.

В заключении автором обобщены полученные данные и выделены основные, наиболее значимые результаты работы. Выводы соответствуют поставленным задачам, согласуются с экспериментальными данными и дополняют данные и идеи других исследователей.

Диссертационная работа поразила качеством написания, мне не удалось найти логических нестыковок в работе. Количество опечаток для такого объёмного труда минимально. Есть лишь одно лингвистическое замечаний, во время чтения резало глаз сочетание «остаток аргинина» и т.д. На мой взгляд, лучше писать либо полностью «аминокислотный остаток аргинина», либо «боковая группа аргинина».

Высказанное в отзыве замечание носит рекомендательный характер и не умаляют ценности исследования. Полученные Бакуновой А.К. результаты не вызывают сомнений в их достоверности, поскольку получены путем проведения большого количества экспериментов с использованием современных методов и оборудования. Положения и выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы и полностью подтверждены приведенными экспериментальными результатами. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях, опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Бакуновой Алины Константиновны «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*: каталитические свойства и структура», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия по своему содержанию, актуальности выбранной темы, уровню проведенных исследований, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере соответствуют требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Бакунова А.К., заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник, руководитель группы структурных исследований макромолекулярных комплексов Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Институт белка РАН,
кандидат физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

А.Г. Габдулхаков



142290 Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 4.

Телефон: +7 (496) 7318284

Электронная почта: azat@vega.protres.ru

Я, Азат Габдрахманович Габдулхаков, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело соискателя и дальнейшую обработку.

А.Г. Габдулхаков



«Подпись к.ф.-м.н. А.Г. Габдулхакова заверяю»

Ученый секретарь Института белка РАН

Кандидат биологических наук



Е.Ю. Никонова

23.09.24r