ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Бакуновой Алины Константиновны «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*: каталитические свойства и структура», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы

Исследования, связанные с ферментативным катализом, в настоящее время представляют интерес не только с точки зрения расширения фундаментальных знаний, но и как основа химических технологий, включая технологии получения сахаров, антибиотиков, аминокислот и также в процессах тонкого органического синтеза. Высокая специфичность ферментов, низкая температура процессов (обычно до 50°C), относительная простота технологических решений делают ферментативные методы высокоэкологичными и энергетически выгодными, кроме того, биотехнологические методы оверэкспрессии рекомбинантной ДНК в клетках микробов позволили сделать производство ферментов гораздо более дешёвым, а получаемые продукты не требуют значительных затрат на их очистку.

Ферменты, зависимые от пиридоксаль-5′-фосфата, благодаря химии кофактора обладают значительной каталитической универсальностью и катализируют ряд химических реакций, таких как декарбоксилирование, рацемизация, β- и γ-элиминирование и замещение, разрыв и образование углерод-углеродных связей, трансаминирование. Поэтому пиридоксалевый катализ представляет интерес как мощный инструмент в биотехнологии для производства целого ряда специфических аминокислот и их производных с помощью зеленой химии.

Трансаминазы D-аминокислот относятся к биотехнологически значимым пиридоксаль-зависимым ферментам (*R*)-стереоселективного

аминирования органических соединений. Но на сегодня понимание молекулярных аспектов ферментативного (*R*)-стереоселективного аминирования ограничено небольшим набором фундаментальных структурно-функциональных исследований нескольких гомологичных трансаминаз D-аминокислот.

Поэтому поставленная в данной работе задача выявления особенностей организации и функционирования активных центров новых трансаминаз D-аминокислот, в частности, анализ взаимосвязи структуры и функции новой неканонической трансаминазы D-аминокислот из *H. hydrossis*. представляет как фундаментальный, так и значительный практический интерес.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В работе обсуждается вопрос механизма связывания субстратов с α-карбоксильной группой и без нее в активном центре трансаминазы из *H. hydrossis*. Рассмотрена роль удаленных остатков в поддержании рабочего состояния кофактора. Проанализированы факторы, стабилизирующие холофермент в реакционных условиях. Впервые для трансаминаз D-аминокислот проведен детальный анализ предстационарной кинетики, структурно-функциональная характеристика рекомбинантной формы новой трансаминазы, описан новый активный центр у трансаминаз D-аминокислот, установлена многофункциональность остатков аргинина активного центра. В ходе исследования определены подходы к 100% реактивации трансаминазы. Показана возможность применения трансаминазы из *H. hydrossis* как биокатализатора синтеза разнообразных ароматических и алифатических D-аминокислот с энантиомерным избытком более 99%. По результатам исследований в банк данных белковых структур депонированы пять структур. Полученные результаты представляют интерес как с точки зрения фундаментального исследования взаимосвязи структуры и функции ферментов, так и с практической точки зрения применения трансаминаз D-аминокислот в синтетической химии и их направленной модификации.

Характеристика разделов работы

Диссертационная работа Бакуновой А.К. построена стандартным образом и состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждения», «Заключение» и «Список литературы». Диссертация изложена на 131 странице, список цитируемой литературы включает 240 источников. Диссертационная работа носит полноценный и завершенный характер, как с точки зрения оформления, так и в вопросе научной ценности.

Во введении четко обоснована цель и актуальность исследования, обозначена ожидаемая практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» автор всесторонне освещает состояние проблемы по теме диссертационной работы. Дана общая информация о функционировании PLP-зависимых ферментов. В обзоре автором детально описан механизм трансаминирования. Кроме того, автор привела необходимые для понимания сути работы детали связывания и стабилизации кофактора в активном центре трансаминаз. Дан подробный анализ активных центров суперсемейства трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена. В заключение приведены примеры применения трансаминаз как биокатализаторов стереоселективного аминирование кетосоединений.

В главе «Материалы и методы» описаны объекты и материалы исследований, дано подробное описание используемых методов. Этот раздел включает как работы по получению плазмидных конструкций и мутагенезу, так и работы по анализу ферментов, включающие наработку, выделение и очистку белка, ферментативную кинетику, спектральный анализ (спектрофотометрию, спектрофлуоресценцию, спектроскопию кругового дихроизма), анализ стабильности, кристаллографию.

В следующей главе диссертации «Результаты и их обсуждения» представлены оригинальные экспериментальные результаты и их обсуждение. В первой части главы «Результаты и их обсуждения»

представлена работа по получению и очистке рекомбинантной формы трансаминазы из бактерии *H. hydrossis*, определены оптимальные условия функционирования, кинетические параметры реакций трансаминирования и проанализирована термостабильность фермента. Далее исследованы различные аминодоноры и исследована предстационарная кинетика реакции трансаминирования методом остановленного потока. Затем проведена кристаллизация, определена и проанализирована пространственная структура трансаминазы в холоформе и в комплексе с ингибитором D-циклосерином, сравнительный анализ полученных структур с известными ранее трансаминазами IV типа укладки позволил выделить особенности новой организации активного центра. Следующим шагом работы стал структурно-функциональный анализ мутантных форм фермента, проведенный анализ позволил выявить роли остатков аргинина в функционировании трансаминазы, а именно в связывании субстратов, стабилизации кофактора, и стабильности функционального димера. В завершающей части работы проанализирована возможность применения трансаминазы из *H. hydrossis* в качестве биокатализатора стереоселективного аминирования для синтеза оптически чистых D-аминокислот. Полученные данные исчерпывающе представлены в табличной форме, а также в виде графиков и спектров, показана статистическая значимость результатов и дан подробный анализ зависимостей. Полученные результаты логически дополняют друг друга, тщательно проанализированы и обсуждены.

В разделах «Заключение» и «Выводы» кратко суммированы полученные в работе научные результаты.

Работа написана логично, легко читается и очень аккуратно оформлена. Замечаний к работе нет, но хотелось бы задать несколько вопросов.

Есть ли в организме H.hydrossis другие ферменты, связанные с метаболизмом D-аминокислот? Известно ли что-то об их функции, или о функции их гомологов?

Для трансаминазы из *H. hydrossis,* как и для других трансаминаз, вы наблюдаете диссоциацию холофермента, что очевидно может быть проблемой при разработке биотехнологических технологий. Действительно ли у трансаминазы Halhy эта диссоциация больше, чем у ранее охарактеризованных трансаминаз D-аминокислот и тогда чем можно объяснить такую нестабильность холофермента и насколько, по вашему мнению, это снижает эффективность работы трансаминазы Halhy в клетке? Есть ли, помимо реактивации добавлением кофактора, пути снижения подобной нестабильности, в частности, используя обнаруженную вами возможность участия удаленных остатков аминокислот в стабилизации кофактора?

В целом, работа заслуживает очень высокой оценки, все выносимые на защиту положения являются обоснованными. Исследование проведено на высоком методологическом уровне, хорошо спланировано и четко направлено на решение поставленных задач, экспериментальные результаты подробно изложены и корректно интерпретированы. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных. Полученные результаты существенно расширяют представления о функционировании трансаминаз D-аминокислот. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы. Материалы диссертации были апробированы на российских и международных конференциях, опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science.

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 полностью 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:

главный научный сотрудник, и.о. заведующей лабораторией биомолекулярного скрининга Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФАВ РАН),
доктор химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Е.Ф. Шевцова

142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1.
Телефон: +7-(496)-524-2606
Электронная почта: shevtsova@ipac.ac.ru

Я, Шевцова Елена Феофановна, 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.

Е.Ф. Шевцова

«Подпись д.х.н. Е.Ф. Шевцовой заверяю»
Директор
ИФАВ РАН
доктор биологических наук А.А. Устюгов

26.03.24г