

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

Аттестационное дело №

Решение диссертационного совета от 26 мая 2022 г.

о присуждении Безсудновой Екатерине Юрьевне, гражданство Российская Федерация, ученой степени доктора химических наук

Диссертация «Взаимосвязь структуры и функции ферментов из термофильных организмов на примере дегидрогеназ и трансаминаз» по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 18 февраля 2022 года (протокол №1) диссертационным советом 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета и в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. №74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учетом переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк и от 13.03.2019 № 222/нк, от 03.06.2021 №561/нк.

Соискатель

Безсуднова Екатерина Юрьевна, 1969 года рождения, окончила в 1991 г. Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, прошла обучение в очной аспирантуре Химического факультета МГУ и в 2000 г. защитила кандидатскую диссертацию «Моделирование действия гидролаз на примере гидролиза эфиров гидроксibenзойных кислот» на кафедре химической энзимологии Химического факультета по специальности химическая кинетика и катализ (02.00.15). С 2001 г. Екатерина Юрьевна работает в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН в должности старшего научного сотрудника.

Научный консультант

Попов Владимир Олегович, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», научный руководитель Центра, лаборатория инженерной энзимологии, заведующий лабораторией.

Официальные оппоненты:

Габибов Александр Габибович, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, директор ИБХ РАН, лаборатория биокатализа, заведующий лабораторией.

Демидкина Татьяна Викторовна, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория химических основ биокатализа, заведующий лабораторией.

Никулин Алексей Донатович, доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук, заместитель директора по науке, лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, главный научный сотрудник.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен тем, что:

доктор химических наук, профессор, академик РАН Габибов Александр Габибович является одним из ведущих отечественных специалистов в области биокатализа, биотехнологий и энзимологии;

доктор химических наук, профессор Демидкина Татьяна Викторовна является одним из ведущих отечественных специалистов в области пиридоксаль-фосфат зависимых ферментов, включая трансаминазы, гамма-лиазы и декарбоксилазы;

доктор химических наук, главный научный сотрудник Никулин Алексей Донатович является одним из ведущих отечественных специалистов в области структурной биологии, рентгено-структурного анализа и молекулярной биологии.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них значительного числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Все три официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Безсудновой Е.Ю.

Ведущая организация, Санкт-Петербургский государственный университет, в своем положительном отзыве, составленном доктором биологических наук, профессором кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ Падкиной Мариной Владимировной и утвержденном Проректором по научной работе СПбГУ кандидатом физико-математических наук Микушевым Сергеем Владимировичем указала, что диссертация Безсудновой Е.Ю. является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, которая полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением

Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., в действующей редакции, а автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что Санкт-Петербургский государственный университет является признанным отечественным и международным научным центром в области биохимии, молекулярной биологии, генетики и структурной биологии, который имеет в своем составе подразделения, изучающие строение и свойства ферментов из бактерий и эукариот. Таким образом, сотрудники СПбГУ, в том числе составившая и подписавшая отзыв Падкина М.В. являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования в областях, связанных с тематикой диссертационной работы Безсудновой Е.Ю.

В целом высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Результаты диссертационной работы Безсудновой Е.Ю. опубликованы в 22 статьях в российских и международных рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science и входящих в перечень ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842. В ходе работы получены и проанализированы 16 пространственных структур, координаты атомов депонированы в Банк данных белковых структур (PDB коды 3TN7, 5EEB, 5F2C, 5EUY, 5EXF, 5EK6, 5CE8, 6THQ, 5CM0, 5E25, 6ERK, 6H65, 6Q8E, 6GKR, 7NEA, 7NEB).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в международных журналах

1. Stekhanova T.N., Mardanov A.V., **Bezsudnova E.Y.**, Gumerov V.M., Ravin N.V., Skryabin K.G., Popov V.O. Characterization of a thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus* // Appl Environ Microbiol.-2010.-V.76.-P.4096-4098.
2. Lyashenko A.V., **Bezsudnova E.Y.**, Gumerov V.M., Lashkov A.A., Mardanov A.V., Mikhailov A.M., Polyakov K.M., Popov V.O., Ravin N.V., Skryabin K.G., Zabolotniy V.K., Stekhanova T.N., Kovalchuk M.V. Expression, purification and crystallization of a thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from the archaeon *Thermococcus sibiricus* // Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.-2010.-V.66.-P.655-657.
3. **Bezsudnova E.Y.**, Boyko K.M., Polyakov K.M., Dorovatovskiy P.V., Stekhanova T.N., Gumerov V.M., Ravin N.V., Skryabin K.G., Kovalchuk M.V., Popov V.O. Structural insight into the molecular basis of polyextremophilicity of short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus* // Biochimie.-2012.-V.94.№12.-P.2628-2638.
4. Stekhanova T.N., **Bezsudnova E.Y.**, Mardanov A., Gumerov V.M., Artemova N., Kleymenov S.Y., Popov V.O. Sodium chloride-induced modulation of the activity and thermal stability of short-chain oxidoreductase from the archaeon *Thermococcus sibiricus* // Appl Biochem Biotechnol.-2013.-V.171.№7.-P.1877-1889.

5. **Bezudnova E.Y.**, Petrova T.E., Popinako A.V., Antonov M.Y., Stekhanova T.N., Popov V.O. Intramolecular hydrogen bonding in the polyextremophilic short-chain dehydrogenase from the archaeon *Thermococcus sibiricus* and its close structural homologs // *Biochimie*.-2015.-V.118.-P.82-89.
6. Boyko K.M., Stekhanova T.N., Nikolaeva A.Y., Mardanov A.V., Rakitin A.L., Ravin N.V., **Bezudnova E.Y.**, Popov V.O. First structure of archaeal branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* specific for L-amino acids and R-amines // *Extremophiles*.-2016.-V.20.№2.-P.215-225.
7. **Bezudnova E.Y.**, Petrova T.E., Artemova N.V., Boyko K.M., Shabalin I.G., Rakitina T.V., Polyakov K.M., Popov V.O. NADP-Dependent Aldehyde Dehydrogenase from Archaeon *Pyrobaculum sp.1860*: Structural and Functional Features // *Archaea*.-2016.-V.10.-ID9127857.-P.1-14.
8. **Bezudnova E.Y.**, Stekhanova T.N., Suplatov D.A., Mardanov A.V., Ravin N.V., Popov V.O. Experimental and computational studies on the unusual substrate specificity of branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* // *Arch Biochem Biophys*.-2016.-V.607.-P.27-36.
9. Stekhanova T.N., Rakitin A.L., Mardanov A.V., **Bezudnova E.Y.**, Popov V.O. A Novel highly thermostable branched-chain amino acid aminotransferase from the crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia* // *Enzyme Microb Technol*.-2017. V.96.-C.127-134.
10. **Bezudnova E.Y.**, Stekhanova T.N., Popinako A.V., Rakitina T.V., Nikolaeva A.Y., Boyko K.M., Popov V.O. Diaminopelargonic acid transaminase from *Psychrobacter cryohalolentis* is active towards (S)-(-)-1-phenylethylamine, aldehydes and α -diketones // *Appl Microbiol Biotechnol*.-2018.-V.102.№22.-P. 9621-9633.
11. **Bezudnova E.Y.**, Dibrova D.V., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Popov V.O. Identification of branched-chain amino acid aminotransferases active towards (R)-(+)-1-phenylethylamine among PLP fold type IV transaminases // *J Biotechnol*.-2018.-V. 10.№271.-P.26-28.
12. Zeifman Y.S., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Timofeev V.I., Rakitina T.V., Popov V.O., **Bezudnova E.Y.** Functional characterization of PLP fold type IV transaminase with a mixed type of activity from *Haliangium ochraceum* // *Biochim Biophys Acta*. -2019.-V.1867.№6.-P.575-585.
13. Isupov M.N., Boyko K.M., Sutter J.M., James P., Sayer C., Schmidt M., Schönheit P., Nikolaeva A.Y., Stekhanova T.N., Mardanov A.V., Ravin N.V., **Bezudnova E.Y.**, Popov V.O., Littlechild J.A. Thermostable Branched-Chain Amino Acid Transaminases From the Archaea *Geoglobus acetivorans* and *Archaeoglobus fulgidus*: Biochemical and Structural Characterization // *Front Bioeng Biotechnol*.-2019.-V.7.№7.-P.1-16.
14. **Bezudnova E.Y.**, Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Zeifman Y.S., Rakitina T.V., Suplatov D.A., Popov V.O. Biochemical and structural insights into PLP fold type IV transaminase from *Thermobaculum terrenum* // *Biochimie*.-2019.-V.158.-P.130-138.
15. **Bezudnova E.Y.**, Nikolaeva A.Y., Kleymenov S.Y., Petrova T.E., Zavialova S.A., Tugaeva K.V., Sluchanko N.N., Popov V.O. Counterbalance of stability and activity observed for thermostable transaminase from *Thermobaculum terrenum* in the presence of organic solvents // *Catalysts*.-2020.-V.10.№1024.-P.1-12.

16. **Bezsudnova E.Y.**, Stekhanova T.N., Ruzhitskiy A.O., Popov V.O. Effects of pH and temperature on (S)-amine activity of transaminase from the cold-adapted bacterium *Psychrobacter cryohalolentis* // *Extremophiles*.-2020.-V.24.№4.-P.537-549.

17. **Bezsudnova E.Y.**, Popov V.O., Boyko K.M. Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases // *Appl Microbiol Biotechnol*.-2020.-V.104.№6.-P.2343-2357. Обзор

18. **Bezsudnova E.Y.**, Nikolaeva A.Y., Bakunova A.K., Rakitina T.V., Suplatov D.A., Popov V.O., Boyko K.M. Probing the role of the residues in the active site of the transaminase from *Thermobaculum terrenum* // *PLoS One*.-2021.-V.16.№7. –С.e0255098.

Статьи в российских изданиях:

1. **Безсуднова Е.Ю.**, Бойко К.М., Попов В.О. Свойства бактериальных и архейных трансаминаз разветвленных аминокислот // *Усп. биол. химии*.-2017. Т.82.№13.-С.1572-1591. Обзор.

2. Попинако А.В., Антонов М.Ю., **Безсуднова Е.Ю.**, Попов В.О. Роль заряженных остатков в структурной адаптации к повышенным температурам у короткоцепочечных алкогольдегидрогеназ (SDR) из термофильных организмов. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*.-2018.-Т. 59.№ 5.-С.354-360.

3. Бойко К.М., Николаева А.Ю., Тимофеев В.И., Попов В.О., **Безсуднова Е.Ю.** Пространственная структура трансаминазы разветвленных аминокислот из *Thermoproteus uzoniensis* в комплексе с L-норвалином // *Кристаллография*.-2020.- Т.65.№5.-С.740-743.

4. **Безсуднова Е.Ю.**, Стеханова Т.Н., Бойко К.М., Попов В.О. Влияние кетосубстрата на выход продукта в реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазой из *Thermoproteus uzoniensis* // *Доклады Академии Наук*. -2020.-Т.490.№1.-С.5-8.

Патент:

Патент РФ на изобретение № RU2413766 от 10.03.2011. Безсуднова Е.Ю., Бонч-Осмоловская Е.А., Гумеров В.М., Марданов А.В., Попов В.О., Равин Н.В., Скрыбин К.Г., Стеханова Т.Н.// Термостабильная алкогольдегидрогеназа из археи *Thermococcus sibiricus*. Патент № 2413766 от 10.03.2011

Результаты исследования были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конгрессах: The 45th FEBS congress в 2021 г. (Любляна), *Extremophiles-2014* (Санкт-Петербург), *Extremophiles-2016* (Киото), *Extremophiles-2018* (Искья), Европейский биотехнологический конгресс (Стамбул) в 2011 г., на международных конференциях *Protein Stabilization* (Милан) в 2014 г., 13th international meeting *Thermophiles* (Сантьяго) в 2015 г., *Novel Enzymes* (Дармштадт) в 2018 г., "Biocatalysis-2013: Fundamentals and applications" (Москва), "Biocatalysis-2015: Fundamentals and applications" (Истра), "Biocatalysis-2019: Fundamentals and applications" (Санкт-Петербург), The 13th International Conference on Salt Lake Research (Улан-Удэ) в 2017 г., а также на V Съезде биохимиков России в Дагомьсе в 2016 г., на Первом Российском кристаллографическом конгрессе в Москве в 2016 г. и научных конференциях ФИЦ «Биотехнологии» РАН (Москва) в 2016, 2018, 2019 и 2021 гг.

Избранные тезисы докладов:

1. **Bezudnova E.**, Stekhanova T., Boyko K., Polyakov K., Ravin N., Popov V. // Structural features of thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*. (Istanbul) 2011. Curr Opin Biotech (Suppl 1) V. 22. P. S85.
2. **Bezudnova E.**, Petrova T., Boyko K.M., Rakitina T.V., Popov V.O. // Crystal structure of NADP+-dependent thermostable aldehyde dehydrogenase from *Pyrobaculum* sp.1860: implications for the cofactor binding at high temperatures. 10th International Congress on Extremophiles. 2014 (St.Petersburg). Book of abstracts: P. 252.
3. **E. Bezudnova**, T. Petrova, K. Boyko, T. Stekhanova, N. Ravin, V. Popov // Two thermostable archaeal Rossmann-fold dehydrogenases: two NADP binding modes – two different stabilities of binary complexes. Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications (Moscow) 2013: Book of abstracts: P. 69.
4. **E. Bezudnova**, T. Stekhanova, A. Mardanov, A. Rakitin, A. Nikolaeva, K. Boyko, V. Popov // Why typical branch-chain transaminases have untypical substrate specificity? Biocatalysis-2015: Fundamentals & Applications (г. Истра) 2015: Book of abstracts: P. 112.
5. **E. Bezudnova**, T. Stekhanova, A. Mardanov, A. Rakitin, A. Nikolaeva, K. Boyko, V. Popov // New archaeal branch-chain transaminases: high thermostability, typical structure and untypical substrate specificity. XIIIth congress Thermophiles (Santiago) 2015: Book of abstracts: P. 99.
6. **Bezudnova E.**, Dibrova D., Nikolaeva A., Stekhanova T., Boyko K., Rakitina T., Popov V. // Can thermostable branched-chain amino acid aminotransferases from archaea and thermophilic bacteria be R-selective with primary amines. 11th International Congress on Extremophiles. (Kyoto) 2016. Book of abstracts: P. 301.
7. **Безуднова Е.**, Бойко К., Суплатов Д., Марданов А., Николаева А., Стеханова Т., Равин Н., Попов В.О. Необычная субстратная специфичность трансаминазы разветвленных аминокислот из археи *Thermoproteus uzoniensis*. Первый Российский кристаллографический конгресс. (Москва) 2016: Материалы конференции. С. 199
8. **Е. Безуднова**, К. Бойко, А. Марданов, А. Николаева, Т. Стеханова, Д. Суплатов, Н. Равин, В. Попов // Трансаминазы разветвленных аминокислот из архей *Thermoproteus uzoniensis* и *Vulcanisaeta moutnovskia*: типичная структура и нетипичная субстратная специфичность. V Съезде биохимиков России (Дагомыс) 2016. Acta Naturae. Спецвыпуск Т.2. С. 32.
9. **Bezudnova E.**, Nikolaeva A., Popinako A., Stekhanova T., Boyko K., Popov V. // Polyextremophilic enzymes from archaea and bacteria: structural and functional features. 13th International Conference Salt Lake Research. (Ulan-Ude) 2017. Book of abstracts: P. 65.
10. **Bezudnova E.**, Nikolaeva A., Rakitina T, Golovachov Y., Boyko K., Popov V. // Polyextremophilic transaminase of PLP fold type IV from *Thermobaculum terrenum*: substrate specificity, 3D-structure and stability in water-organic media. 12th International Congress on Extremophiles. 2018 (Ischia) Book of abstracts: P. 16.
11. **Bezudnova E.**, Boyko K., Rakitina T., Zeifman Y., Nikolaeva A., Dibrova D., Suplatov D., Popov V. // Effects of amino acid substitutions in the characteristic sequence motifs

on the profile of substrate specificity of PLP fold type IV transaminases. Biocatalysis-2019: Fundamentals & Applications. (St.Petersburg) 2019. Book of abstracts: P. 50.

12. **E. Bezsudnova**, A. Nikolaeva, , A. Bakunova, T. Rakitina, K. Boyko, V. Popov // Regulation of the activity of pyridoxal-5'-phosphate-dependent transaminases by water-miscible organic solvents. 45th FEBS Congress. (Lubljana) 2021. FEBS Open Bio (Suppl. 1) V. 11. P. 255.

В указанных публикациях адекватно отражены результаты исследования, представленного в диссертационной работе Безсудновой Е.Ю.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента, доктора химических наук, профессора, академика РАН, **Габиева Александра Габиевича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

Раздел 3.6 «Специфичность к первичным (S)-аминам трансаминазы I типа PLP-укладки из холодоактивной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis*» включает анализ трансаминазы, стабильной и активной в широком диапазоне температур. Для этой трансаминазы подробно рассмотрена дополнительная активность с первичными (S)-аминными. Раздел хорошо написан, однако, остается непонятным, почему автор поместил этот раздел в работу, посвященную термостабильным ферментам.

Есть еще ряд замечаний:

1. Утверждение автора в литературном обзоре "все ферменты имеют дополнительную (promiscuous) каталитическую активность или субстратную специфичность – латентную или охарактеризованную" носит спорный характер. Имеются высокоспецифичные и "высокопрофессиональные" ферменты, например, каспазы, выполняющие единственную функцию – процессинг белков при апоптозе.

2. Литобзор несколько перегружен и содержит много малозначительных данных. В то же время автор, говоря о поиске биокатализаторов "de novo" не уделил должного внимания работам с библиотеками ферментов и антител, скрининговым технологиям, а также современным QM/MM подходам в описании ферментативных реакций. Недостаточно отражены работы, использующие разумное соотношение рационального дизайна и скрининговых технологий. В работах, описывающих ферментативное трансаминирование недостаточно внимания уделено работам Эсмонда Снелла, успешно дополняющим работы Александра Браунштейна, а также механизму трансаминирования открытому Михаилом Шемякиным и Александром Браунштейном. А также работы академиков Браунштейна и Вайнштейна по рентгено-структурному анализу трансаминаз и других витамин B6-зависимых ферментов.

3. Несмотря на значительный объем полученных данных, необходимо признать, что автор в основном базировался в своих исследованиях на исследования в области 3D биологии, а именно рентгено-структурного анализа. Вместе с тем, особенно в витамин B6-зависимых ферментах существенные открытия были сделаны с помощью кинетических подходов, которые позволили охарактеризовать стадийность процессов. Эти подходы особенно важны при характеристике функциональности биокатализатора. Классические работы Хаммета и Фазеллы заложили основы механизмов ферментативных реакций,

верифицированных с помощью "остановленной струи" и "температурного скачка". Сравнение ферментов, обладающих столь "богатой гаммой спектральных ответов", делает оправданным предстационарные прецизионные исследования. Эти подходы не были использованы в диссертации.

В отзыве отмечается, что высказанные замечания являются пожеланием автору для дальнейшего развития сформированного им направления и не могут быть рассмотрены как принципиальные.

Отзыв официального оппонента, доктора химических наук, профессора **Демидкиной Татьяны Викторовны** (положительный). Отзыв содержит следующее замечание:

В полной реакции рН-оптимум активности НО303 составил рН 11, в то время как для канонических трансаминаз максимальная активность наблюдается при рН 7.0 – 8.0. Обсуждая этот факт, Е. Ю. Безсуднова заключает (стр. 190): «Таким образом, наблюдаемый щелочной сдвиг рН-профиля НО3033, по-видимому, связан с особым распределением зарядов в активном центре. Возможно, эти изменения вызывают увеличение рКа атома азота N4' альдимины, и, как результат, эффективное трансаминирование начинается при рН>9,0. Снижение активности НО3033 при рН 11,0 и выше определяется как диссоциацией кофактора из активного центра, так и депротонированием (R)-PEA (рКа = 9,8). Данные предположения согласуются с принятым механизмом трансаминирования, когда реакционной форме фермента соответствует депротонированная форма основания Шиффа при протонированной форме субстрата. Депротонированная форма субстрата-аминодонора в таких условиях является неактивной. Не совсем понятно, что имеется в виду под реакционной формой фермента. Для нуклеофильной атаки аминокислоты субстрата на С4'-атом кофермента (т.е. для образования внешнего альдимины) требуется протонированная аминокислота и наличие протонированного атома азота альдимины, что повышает электрофильность С4'-атома кофермента, способствуя нуклеофильной атаке аминокислоты. Действительно, холофермент наиболее досконально изученной (в том числе с участием отечественных ученых) аспартаттрансаминазы в рН-оптимуме существует в нейтральной форме, т.е. с протонированным атомом азота пиридинового кольца и диссоциированной оксигруппой. Электростатические взаимодействия субстрата и фермента при образовании комплекса Михаэлиса приводят к тому, что в образовании внешнего основания Шиффа участвуют депротонированная группа аминокислоты и форма кофермента с протонированным атомом азота внутреннего альдимины. Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые ферменты, благодаря кофактору, обладают уникальными спектральными характеристиками, позволяющими определить как ионные и таутомерные формы их внутренних альдиминов, так и химическую структуру, ионные и таутомерные формы интермедиатов катализируемых ими реакций. Ионную форму внутреннего альдимины НО3033 в рН-оптимуме можно было определить спектрофотометрически.

Указанное замечание не является принципиальным. Приоритетные результаты диссертационной работы Е.Ю. Безсудновой следует рассматривать как научное достижение. Отмечено, что работа выполнена с применением большого количества современных методов физико-химической биологии и демонстрирует высокий экспериментальный и теоретический уровень автора. Работа Е.Ю. Безсудновой написана грамотным языком и тщательно оформлена.

Отзыв официального оппонента, доктора химических наук, главного научного сотрудника **Никулина Алексея Донатовича** (положительный). Существенных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы не имеются. Отмечено, что интересным является вывод о повышении активности термостабильных ферментов дегидрогеназы из *T. sibiricus* и трансаминазы из *T. terrenum* при субоптимальных температурах из-за нарушения контактов в белковой глобуле под действием органических растворителей или высокой концентрации соли. Сравнительный анализ перечисленных ферментов с мезофильными аналогами позволил сделать вывод об адаптации термостабильных ферментов к высоким температурам на уровне их структуры при минимальных изменениях их активных центров, которые, тем не менее приводят к изменению субстратной специфичности фермента. Вот на этом месте явно не хватает еще одного смелого шага и предложения гипотезы о том, что «усиление» стабильности структуры приводит к уменьшению активности ферментов, которое нивелируется увеличением скорости протекания химических реакций при повышенных температурах жизни архей или термофильных бактерий; в то же время, ферменты мезофильных организмов должны позволить себе большую активность за счет более «рыхлой» и активной структуры фермента, но приводящей к меньшей стабильности фермента. Возможно, автору еще предстоит проверить такое предположение в будущем.

Отзыв ведущей организации, Санкт-Петербургского государственного университета (положительный). Согласно отзыву, диссертационная работа Безсудновой Е.Ю. вносит существенный вклад в понимание структуры, функции, механизмов действия, субстратной специфичности, физико-химических и кинетических характеристик ферментов из архей и термофильных бактерий. Отзыв содержит следующие вопросы:

1. Известно ли что-нибудь об изменениях в регуляторных последовательностях генов, кодирующих ферменты, при изменении спектра их субстратной специфичности (переход от широкой к узкой субстратной специфичности)?
2. Существуют ли данные об использовании технологии поверхностного дисплея у архей и экстремофильных бактерий для исследованных в диссертации ферментов?
3. Чем обусловлены разные условия индукции (время и температура) синтеза исследуемых ферментов в клетках *E. coli*?
4. Почему не оптимизировали кодоны структурного гена альдегиддегидрогеназы A1DHPy1147, что, возможно, позволило бы избежать дополнительных процедур по ренатурации белка?
5. Параметры реакций окисления и восстановления TsAdh319, приведенные в тексте диссертации (с.101), в подписи под рисунком 3.1, на рисунке 3.1 и в таблице 3.1, противоречат друг другу. Какие же значения pH являются оптимальными для работы TsAdh319 в реакциях окисления и восстановления?
6. Почему библиографическая ссылка на t-критерий Кохрана-Кокса приведена непосредственно в тексте (с.134)?

Высказанные замечания и вопросы не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

На автореферат поступили положительные отзывы от

Клячко Натальи Львовны, доктора химических наук, профессора по кафедре химической энзимологии Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, замечаний нет.

Швьадаса Витаутаса-Юозапаса Каятоно, доктора химических наук, профессора факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, замечаний нет.

Зверевой Марии Эмильевны, доктора химических наук, профессора кафедры химии природных соединений, заместителя декана по научной работе химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Отзыв не имеет замечаний, но содержит вопрос:

Являются ли характеристические мотивы трансаминаз исчерпывающей характеристикой их субстратной специфичности? Возможен ли пересмотр современных представлений о характеристических мотивах трансаминаз с тем, чтобы охватить все известные последовательности трансаминаз?

Петровой Татьяны Евгеньевны, кандидата физико-математических наук, старшего научного сотрудника Лаборатории кристаллографии макромолекул Института математических проблем биологии РАН, Филиала ИПМ им. М.В.Келдыша РАН, замечаний нет.

Готтих Марины Борисовны, доктора химических наук, профессора, заведующего отделом химии нуклеиновых кислот Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова. Отзыв не содержит замечаний, но содержит вопрос:

являются ли обнаруженные нарушения в характеристических мотивах трансаминаз указанием на ограниченность такого подхода для идентификации новых трансаминаз?

Хомутова Алексея Радиевича, доктора химических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта Российской академии наук, замечаний нет.

Бонч-Осмоловской Елизаветы Александровны, доктора биологических наук, профессора, член-корр. РАН, заведующего кафедрой микробиологии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, замечаний нет.

С вопросами выступили:

д.б.н. Шумянцева В.В., к.б.н. Александров А.И., д.б.н., профессор, член-корр. РАН Гусев Н.Б., д.б.н., профессор Крицкий М.С., д.б.н. Агафонов М.О., д.б.н., профессор Красновский А.А.

В дискуссии приняли участие:

д.б.н., профессор Левицкий Д.И., д.х.н., профессор Дзантиев Б.Б., д.б.н., профессор Крицкий М.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований **получены следующие основные результаты:**

1. Обнаружен и охарактеризован фермент с уникальной термостабильностью – алкогольдегидрогеназа из архей *Thermococcus sibiricus*, время полуинактивации которой при 98 °С составило один час. Стратегия термостабилизации фермента сводится к усилению белковой глобулы водородными связями всех категорий и укреплению поверхности белковой глобулы солевыми мостиками.

2. Проведена структурно-функциональная характеристика дегидрогеназ из архей *Thermococcus sibiricus* и *Pyrobaculum ferrireducens*. Установлено, что увеличение доли заряженных остатков в аминокислотной последовательности обоих термостабильных ферментов приводит к повышению плотности водородных связей в белковой глобуле, перераспределению внутренних и поверхностных водородных связей по категориям и усилению межсубъединичных контактов.

3. Сеть солевых мостиков на поверхности супертермостабильной алкогольдегидрогеназы из архей *T. sibiricus* обеспечивает термостабильность фермента, устойчивость к денатурантам и галотолерантность при субоптимальных температурах.

4. Активность термостабильных ферментов, дегидрогеназы из *T. sibiricus* и трансаминазы из *T. terrenum*, повышается при субоптимальных температурах в результате частичного разрушения контактов в белковой глобуле под действием органических растворителей или высокой соли.

5. Отобраны по гомологии и в результате анализа характеристических мотивов новые трансаминазы из архей и термофильных бактерий. Составлена их структурно-функциональная характеристика, включая спектр аминокислотных доноров и аминокислотных акцепторов, кинетические параметры реакций трансаминирования и параметры термостабильности

6. Кристаллические структуры трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена из архей *T. uzoniensis* и *G. acetivorans*, полученные с разрешением 2.0 Å и 1.9 Å позволили установить, что функциональные димеры и активные центры архейных трансаминаз устроены сходным образом с функциональными димерами и активными центрами гомологичных трансаминаз из бактерий и эукариот.

7. Установлено, что изменения в характеристических мотивах, формирующих активный центр исследуемых трансаминаз, определяют широкую субстратную специфичности у трансаминаз разветвленных L-аминокислот из архей *T. uzoniensis* и *V. moutnovskia* и активность с первичными (R)-аминами у трансаминаз из бактерий *T. terrenum* и *H. ochraceum*.

8. Установлено, что трансаминазы из бактерии *T. terrenum* и *H. ochraceum* активны как с первичными (R)-аминами, так и с разнообразными L-аминокислотами.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что:

-В результате структурно-функционального исследования установлены структурные основы термостабильности алкогольдегидрогеназы из архей *T. sibiricus* – уникального фермента с рекордными параметрами термостабильности. Полученные результаты подтвердили значимость электростатических взаимодействий для

термостабилизации белков, эффективность действия которых определяется общим количеством и распределением этих взаимодействий по поверхности.

-Определены структурные аспекты стабилизации и уточнен механизм действия альдегиддегидрогеназы из архей *P. ferrireducens* в результате анализа ее пространственных структур.

-Впервые определены пространственные структуры архейных трансаминаз. На основании проведенных исследований сделан обобщающий вывод о сходном устройстве активного центра у трансаминаз разветвленных L-аминокислот у архей, бактерий и эукариот.

-Расширены фундаментальные представления о субстратной специфичности трансаминаз IV типа укладки пиридоксаль-5'-фосфат связывающего домена. Структурно-функциональная характеристика трансаминаз из бактерий *T. terrenum* и *H. ochraceum* со смешанным типом активности позволила установить, что у пиридоксаль-5'-фосфат зависимых трансаминаз IV типа укладки активность с L-аминокислотами и первичными (R)-аминами не является взаимоисключающей.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

-Охарактеризованные в работе ферменты относятся к биотехнологически значимым и перспективны для разработки биокатализаторов для задач синтетической химии по получению оптически чистых соединений.

-Для термостабильных ферментов предложены подходы к регуляции их активности при субоптимальных температурах в результате введения в реакционную смесь органических растворителей, соли или денатурантов.

- Трансаминаза из *T. terrenum* предложена для разработки на ее основе биокатализатора стереоселективного аминирования для получения оптически чистых аминов или аминокислот

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методы исследования и проведенные расчеты корректны;

-достоверность и воспроизводимость полученных результатов не вызывают сомнений;

-выводы диссертации четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты.

Личный вклад соискателя состоит:

- в постановке задач диссертационного исследования;

- в планировании экспериментов;

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо под его руководством;

- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных результатов;
- в написании и подготовке публикаций по теме диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Безсудновой Е.Ю. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием детального плана исследования, использованием широкого арсенала методов, адекватных поставленным задачам, большим объемом проведенных исследований, их научной новизной и теоретической значимостью. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, соответствуют мировому уровню, обоснованы и логически вытекают из представленных результатов, что подтверждается публикациями в ведущих рецензируемых журналах (22 статьи). Таким образом, данная работа выполнена на высоком методическом уровне, является актуальной как в области фундаментальных исследований в биохимии и энзимологии, так и для практического применения в биокатализе.

На заседании 26 мая 2022 года Диссертационный совет принял решение присудить Безсудновой Екатерине Юрьевне ученую степень доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 11 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – 20

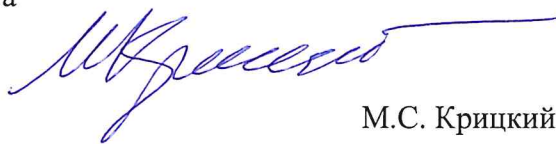
«Против» - нет.

Недействительных бюллетеней нет.

Зам. Председателя диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

Доктор биологических наук, профессор



М.С. Крицкий

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

Кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

26.05.2022