

В связи с вышесказанным диссертационная работа Безсудновой Е. Ю., посвященная структурно-функциональной характеристике ферментов экстремофильных организмов, является весьма **актуальной**.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач, автор использовала интегральный подход, сочетающий классические методы биохимии, включающие различные виды хроматографии и электрофореза, а также методы генетической инженерии и биоинформатики. Для характеристики изучаемых ферментов применялась флуоресцентная спектроскопия, методы кругового дихроизма, динамического светорассеяния, дифференциальной сканирующей калориметрии, рентгеноструктурный анализ. Перед автором диссертации стояла проблема некой методической универсальности, с которой она прекрасно справилась и получила результаты, отличающиеся новизной и представляющие практический интерес.

Научная и практическая значимость работы

Полученные Безсудновой Е. Ю. результаты, бесспорно, обладают научной новизной.

Автором получены структурно-функциональные характеристики новых дегидрогеназ и трансаминаз из архея и термофильных бактерий.

Впервые детально исследована алкогольдегидрогеназа из археи *Thermococcus sibiricus* (TsAdh319), обладающая уникальной термостабильностью и разветвленной сетью солевых мостиков на поверхности молекулы фермента.

Впервые показано, что при субоптимальной температуре проведения реакции активность фермента TsAdh319 повышается в присутствии гидрохлорида гуанидина и хлорида натрия.

Впервые продемонстрировано положительное влияние органических растворителей на активность термостабильной трансаминазы бактерии *Thermobaculum errenum* при субоптимальной температуре реакции.

Продemonстрировано, что увеличение плотности водородных связей в молекуле белка и расширение сети солевых мостиков на поверхности обеспечивают не только термостабильность фермента, но и повышает устойчивость к денатурирующим агентам и влияет на активность в водно-органических средах и в растворах с высокой концентрацией солей.

На основании полученных результатов сделан важный вывод о механизме регуляции активности термостабильных ферментов при субоптимальных температурах.

Впервые получены структуры архейных пиридоксальфосфат-зависимых трансаминаз разветвленных L-аминокислот и сделан вывод о сходной организации активного центра трансаминаз разветвленных L-аминокислот архей, бактерий и эукариот.

При помощи оригинального алгоритма поиска новых трансаминаз на основании изменений характеристических мотивов, которые составляют активный центр и определяют субстратную специфичность, обнаружены и охарактеризованы трансаминазы со смешанным типом активности.

Показано, что трансаминазы из термофильных бактерий *Thermobaculum terrenum* и *Haliangium ochraceum* активны с первичными (R)-аминами.

Впервые было продемонстрировано, что у пиридоксальфосфат-зависимых трансаминаз IV типа укладки активность ферментов с аминокислотами и первичными (R)-аминами не является взаимоисключающей.

. В ходе работы получены и проанализированы 16 новых пространственных структур, координаты атомов депонированы в Банке данных белковых структур (PDB).

. На основании проведенных исследований намечены пути оптимизации условий ферментативных реакций и предложены подходы для разработки биокатализаторов на основе исследованных ферментов для получения оптически чистых соединений.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность представленных в диссертации данных не вызывает сомнений. Обоснованность научных положений и выводов подтверждается приведенными результатами, которые получены при помощи различных современных методов, адекватных поставленным задачам, а также использованием соответствующих статистических методов. Основные результаты работы были представлены на отечественных и международных научных конференциях и изложены в 22 оригинальных статьях в международных высокорейтинговых рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК. Исследования Безсудновой Е. Ю. были поддержаны грантом Российского Научного Фонда и тремя грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Безсудновой Е. Ю. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, которая включает материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Диссертация изложена на 303 страницах, содержит 47 таблиц, иллюстрирована 69 рисунками и 8 схемами. Список литературы включает 431 публикацию.

Во **введении** автор подчеркивает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, приводит сведения об объектах и методах исследования, формулирует основные положения, выносимые на защиту, характеризует новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, отмечает личный вклад в работу, приводит данные об апробации работы и публикациях, перечисляет параметры структуры и объема диссертации.

Обзор литературы состоит из четырех разделов.

В первом разделе рассмотрены современные представления об эволюционных модели возникновения узкоспецифичных ферментов из ферментов с широкой субстратной специфичностью. Приводятся данные о существенной роли изменения среды обитания на изменение субстратной специфичности ферментов микроорганизмов.

В следующем разделе представлены сведения о ферментах архей и экстремофильных бактерий, ферментов, которые обладают уникальной стабильностью при высокой температуре, концентрации солей и в широком диапазоне pH. Подробно рассматривается, какую роль в стабильности ферментов экстремофильных микроорганизмов играют структурные особенности белковой глобулы, распределение определенных аминокислотных остатков на поверхности белка и типы их взаимодействия. На основании рассмотренных данных делается вывод о перспективности ферментов экстремофильных микроорганизмов для создания биокатализаторов.

Третий раздел Обзора посвящен детальному описанию ферментов алкогольдегидрогеназ, альдегиддегидрогеназ трансминаз, обладающих биотехнологическим потенциалом. Подробно рассмотрены механизмы реакций, катализируемых этими ферментами, их структура, организация активного центра и субстратная специфичность. Особое внимание уделено пиридоксальфосфат (PLP)-зависимым трансминазам. Приведены сведения об особенностях трехмерной укладки молекулы фермента, аминокислотном составе структурных элементов, образующих активный центр трансминаз IV типа PLP-укладки, а также о вариантах взаимного расположения ассиметричной молекулы кофактора и субстрата, что определяет стереоспецифичность катализируемой реакции и субстратную специфичность ферментов.

Последний раздел Обзора содержит сведения о современных подходах создания биокатализаторов и возникающих при этом трудностях.

Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, написан логично, хорошим языком, хорошо иллюстрирован.

В главе «**Материалы и методы исследования**» перечислены основные реактивы, использованные в работе, приведены сведения об исследуемых ферментах, полученных при помощи гетерологического синтеза в клетках *E. coli*. Дано подробное описание методов исследования. В частности, методов клонирования и экспрессии структурных генов исследуемых ферментов, выделения и очистки целевых белков при помощи металлоаффинной хроматографии, приведены варианты методов определения активности исследуемых ферментов. Для определения олигомерного состава ферментов использовались гель-фильтрация и электрофорез в неденатурирующих условиях. Для исследования термостабильности белков применяли анализ спектров триптофана. Термодинамические параметры тепловой денатурации белка исследовали при помощи дифференциальной сканирующей калориметрии. Для изучения структурной организации ферментов и активных центров получали кристаллы ферментов и проводили рентгеноструктурный анализ. Для построения пространственных моделей исследуемых ферментов, определения типа и количества водородных связей в молекулах белка, моделирования положения субстрата в активном центре фермента использовали специальные программы. Методы биоинформатики применяли для поиска новых вариантов ферментов и построения филогенетических деревьев. Все использованные методы адекватны поставленным задачам и свидетельствуют о хорошей методической подготовке автора.

В разделе «**Результаты и обсуждение**», который состоит из 6 глав, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты, касающиеся структуры и свойств алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, трансаминазы из термофильных архей, а также трансаминаз из экстремофильных бактерий и сопоставить свои результаты с данными других исследователей.

В первой главе раздела представлены результаты изучения короткоцепочечной НАДФ-зависимой алкогольдегидрогеназы гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus* (TsAdh319). Приведены данные функциональной характеристики фермента, продемонстрировано повышение активности фермента в присутствии 1М NaCl при субоптимальной температуре ферментативной реакции. Сделан обоснованный вывод о возможном влиянии NaCl на конформационную подвижность белковой глобулы за счет экранирования электростатических взаимодействий аминокислотных остатков. Данные рентгеноструктурного анализа позволили заключить, что функциональной единицей TsAdh319 является тетрамер, две субъединицы которого связаны дисульфидной связью. Анализ структуры активного центра и белковой глобулы TsAdh319 показал присутствие

характеристических мотивов, типичных для гомологичных ферментов других организмов. Проведенные исследования особенностей структурной организации молекулы фермента, позволили сделать вывод о том, что важнейшим фактором полиэкстремофильности фермента является множество заряженных остатков на поверхности TsAdh319, которые обеспечивают высокую плотность водородных связей и оказывают стабилизирующее воздействие.

Следующая глава посвящена результатам исследования альдегиддегидрогеназы гипертермофильной археи *Pyrobaculum ferrireducens* (AldhPyr1147). Здесь подробно представлены полученные функциональные характеристики фермента. Приведены сведения о структурных особенностях субъединицы фермента по сравнению с известными гомологами, которые касаются удлинения домена олигомеризации, что по мнению автора может способствовать укреплению контактов в функциональном тетрамере. На основании полученных данных о структуре фермента делаются выводы о деталях отдельных стадий ферментативной реакции, об ориентации субстрата и кофермента в активном центре. Основными факторами температурной адаптации и стабилизации фермента признаны внутренние водородные связи и водородные связи между «заряженным» и «нейтральным» атомами, а также увеличение площади димерных контактов в тетрамере и повышение прочности связывания кофермента реакции. Таким образом, что структурные факторы стабилизации AldhPyr1147 и TsAdh319 различаются.

В третьей главе раздела приведены результаты изучения трансаминаз из гипертермофильных архей *Thermoproteus uzoniensis*, *Vulcanisaeta moutnovskia* и *Geoglobus acetivorans*. Как и в предыдущих главах, здесь представлены функциональные характеристики ферментов. Показано, что трансаминаза из *T. uzoniensis* (TUZN1299), в отличие от канонических трансаминаз разветвленных L-аминокислот, активна с положительно заряженными L-аргинином, L-орнитином и L-гистидином, но не работает с альфа-кетоглутаратом - каноническим вторым субстратом-аминоакцептором в реакциях, катализируемых этими ферментами. На примере TUZN1299 впервые показана активность трансаминаз разветвленных L-аминокислот с первичными аминами. Полученная структура TUZN1299 является первым примером такого фермента архей. Сопоставление полученной структуры TUZN1299 со структурами известных гомологов других организмов показало определенный консерватизм элементов, характерных для трансаминаз IV типа PLP-укладки. В то же время, отмечены изменения аминокислот в O-кармане активного центра, что, вероятно, приводит к неспособности TUZN1299 связывать альфа-кетоглутарат. А появление в O-кармане нескомпенсированного отрицательного заряда, по-видимому, обеспечивает связывание положительно заряженных аминокислот.

Таким образом, автор приходит к выводу, что расширение субстратной специфичности TUZN1299 обусловлено заменами отдельных аминокислот в активном центре фермента.

Аминокислотные последовательности трансаминазы *V. moutnovskia* (VMUT0738) и TUZN1299 совпадают на 54%. По термостабильности VMUT0738 не уступает TUZN1299, также не активна с альфа-кетоглутаратом и работает с положительно заряженными аминокислотами L-орнитином, L-лизином и L-аргинином.

Трансаминаз *G. acetivorans* (GEO1900) по результатам множественного выравнивания и составу характеристических мотивов в последовательности отнесена к трансаминазам разветвленных L-аминокислот. В отличие от архейных ферментов TUZN1299 и VMUT0738, GEO1900 активна, в основном, с разветвленными L-аминокислотами и их линейными аналогами, активна с альфа-кетоглутаратом. Но GEO1900 не работает с положительно заряженными L-аминокислотами, что по мнению автора обусловлено отсутствием у GEO1900 тех замен аминокислот в последовательности O-петли, которые были показаны для архейных трансаминаз. На основании сравнительного анализа структуры и субстратной специфичности трех трансаминаз делается вывод о взаимоисключающем характере связывания положительно и отрицательно заряженных субстратов, обусловленном определенными последовательностями аминокислот в активном центре.

Следующая глава раздела посвящена разработке алгоритма поиска трансаминаз со смешанным типом активности. Для этого на филогенетическом дереве, построенном на основании выборки из 124 прокариотических геномов, которые отнесены к кластеру ортологичных групп COG0115 (Branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychorismate lyase) была выделена группа трансаминаз с нарушениями в характеристических мотивах.

Дальнейший анализ трансаминазы термофильной бактерии *Thermobaculum terrenum* и трансаминазы галотолерантной миксобактерии *Haliangium ochraceum* (HO3033), представленный в главе 5 раздела, показал существенные отличия в характеристических мотивах этих ферментов, что и определило смешанный тип их активности. Продемонстрировано, что в оптимальных условиях проведения реакции трансаминирования субстратная специфичность HO3033 значительно отличается от специфичности известных трансаминаз разветвленных L-аминокислот и (R)-амин:пируват трансаминаз IV типа PLP-укладки. Активность HO3033 в реакциях с (S)-(-)-1-фенилэтиламином и (R)-(+)-1-фенилэтиламином различается, то есть HO3033 является стереоспецифичной трансаминазой. Структура активного центра HO3033 гомологична

структурам известных трансаминаз IV типа PLP-укладки, но определенные замены в характеристических мотивах приводят к появлению смешанного типа активности.

Трансаминаза *T. terrenum* (TaTT), как оказалось, катализирует реакции трансаминирования с референтными субстратами трансаминаз разветвленных L-аминокислот и (R)-амин:пируват трансаминаз IV типа PLP-укладки, и в то же время собственную уникальную реакцию трансаминирования, в которой из (R)-(+)-1-фенилэтиламина и кетокислоты образуются ацетофенон и L-аминокислота. Анализ структуры TaTT выявил отличия как от структур трансаминаз разветвленных L-аминокислот, так и от структур (R)-амин:пируват трансаминаз и трансаминаз D-аминокислот. Использование сайт-направленного мутагенеза позволило заключить, что TaTT не служит переходной формой между трансаминазами разной субстратной специфичности, а является уникальным ферментом с широкой субстратной специфичностью.

Последняя глава раздела содержит результаты изучения трансаминазы из холодоактивной бактерии *Psychrobacter cryohalolentis* (Pcryo361), которая относится к трансаминазам I типа укладки PLP-связывающего домена, которые отличаются специфичностью к L-аминокислотам/(S)-аминам. С помощью молекулярного докинга удалось показать, что связывание (S)-(-)-1-фенилэтиламина в активном центре Pcryo361 происходит в том же месте, что и связывание природного субстрата S-аденозилметионина, в этой области эффективно происходят гидрофобные контакты и стэкинг-взаимодействия.

В Заключении автор подводит краткий итог всей работы и отмечает основные результаты.

Раздел «Обсуждение результатов» в работе отсутствует, но автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей при описании экспериментов.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, вытекают из проведенных экспериментов, четко сформулированы, аргументированы и достоверны.

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов:

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 альдегидрогеназы A1DHPyr1147, 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 рН 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.

Автореферат отражает основную информацию, представленную в диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Безсудновой Екатерины Юрьевны «Взаимосвязь структуры и функции ферментов из термофильных организмов на примере дегидрогеназ и трансминаз» вносит существенный вклад в понимание структуры, функции, механизмов действия, субстратной специфичности, физико-химических и кинетических характеристик ферментов из архей и термофильных бактерий. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области энзимологии, биохимии, структурной биологии и молекулярной эволюции.

Таким образом, диссертационная работа Безсудновой Екатерины Юрьевны «Взаимосвязь структуры и функции ферментов из термофильных организмов на примере дегидрогеназ и трансминаз», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия, является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., в действующей редакции, а автор диссертации заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

Отзыв ведущей организации на диссертацию Безсудновой Е. Ю. обсужден и одобрен на открытом семинаре кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ (протокол №2 от 12 апреля 2022 г.).

Отзыв подготовила доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, профессор кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ.

Профессор кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ, д.б.н.

М.В. Падкина



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9, тел. (812)327-98–27 email: m.padkina@spbu.ru