

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Безсудновой Екатерины Юрьевны «Взаимосвязь структуры и функции ферментов из термофильных организмов на примере дегидрогеназ и трансаминаз», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Диссертационная работа Безсудновой Екатерины Юрьевны «Взаимосвязь структуры и функции ферментов из термофильных организмов на примере дегидрогеназ и трансаминаз» посвящена всеобъемлющему исследованию функциональных и структурных свойств целого ряда ферментов из термофильных организмов. Автор справедливо отмечает, что актуальность представленной работы определяется необходимостью иметь для целей биотехнологического производства широкую линейку активных в производственных условиях ферментов. Наиболее рациональным подходом для достижения такой цели является использование данных по взаимосвязи структур ферментов с их активностью, специфичностью и стабильностью, или, как Екатерина Юрьевна формулирует «понимание взаимосвязи последовательность-структура-функция». Представленная диссертационная работа и сосредоточена на выявление этой взаимосвязи на примере ферментов из термофильных организмов и их сравнении с гомологами из мезофильных организмов.

Екатерина Юрьевна сосредоточилась на исследованиях пространственных структур, субстратной специфичности и

стабильности следующих ферментов: алкогольдегидрогеназы из архей *Thermococcus sibiricus*, альдегиддегидрогеназы из термофильной бактерии *Pyrobaculum ferrireducens*, трансаминаз разветвленных L-аминокислот из архей *Thermoproteus usoniensis*, *Vulkanizaeta moutnovskia*, *Geoglobus acetivorans* и трансаминаз из бактерий *Thermobaculum terrenum* и *Haliangium ochraceum*. Перечисленные ферменты имеют потенциально важное биотехнологическое значение, поскольку могут быть задействованы как для получения важных органических оптически активных продуктов, таких как спирты и амины, так и в составе комплексных цепей преобразования органических соединений в заданное соединение. Применение ферментов с повышенной термической и химической стабильностью позволяет получить существенный технологический выигрыш относительно менее стабильных белков, поэтому они и были выбраны в качестве объектов исследования.

Обзор литературы посвящен рассмотрению имеющихся данных по ферментам из экстремофильных бактерий и архей, их структурным и функциональным особенностям. Отдельно приведены данные по ферментам, имеющих промышленный, биотехнологический потенциал; рассмотрена область их применения. В качестве суммирующей части обзора литературы рассмотрены современные подходы к разработке биокатализаторов и приведены особенности четырех этапов применения ферментов в промышленности. Обзор литературы написан замечательным и доступным языком и достоин для отдельной публикации в научной периодике, близкой к научно-

популярной тематике. На мой взгляд, это блестящий пример творческого отношения к суммированию данных по тематике диссертации.

Раздел «Материалы и методы» приведен в достаточной степени для диссертации на степень доктора наук. В нем подробно описаны используемые методы, но раздел не перегружает читателя тонкими деталями, с которыми можно ознакомиться в оригинальных статьях диссертанта. В этом же разделе приведены статистические характеристики наборов экспериментальных дифракционных данных с кристаллов исследуемых ферментов и их вариантах, а также результирующие данные по уточнению полученных структур.

Глава «Результаты и их обсуждение» содержит подробное обсуждение полученных результатов, причем, благодаря комплексности подходов Екатерины Юрьевны к своей работе, каждый объект исследования рассматривается как с функциональной стороны (биохимические данные), так и со структурной стороны (данные рентгеноструктурного анализа). Такой подход позволил обсудить как активность, так и стабильность ферментов во взаимосвязи со структурой и функцией, причем в сопоставлении с литературными данными по гомологичным белкам. В результате было предложено объяснение стабилизации дегидрогеназ из архей за счет перераспределения и повышения плотности внутренних и внешних водородных связей в этих белках; уникальной стабильности к повышенной температуре, к денатурантам и к высокой концентрации анионов хлора алкогольдегидрогеназы из археи *T. sibiricus* за счет

большого количества солевых мостиков на поверхности белковой глобулы. 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.

Вторая часть экспериментальной работы посвящена рассмотрению структуры и функции другого класса ферментов – пиридоксаль-содержащим трансаминазам разветвленных L-аминокислот IV типа укладки. В этой части работы Екатериной Юрьевной показано, что структура пиридоксаль-содержащего домена

архей имеют высокую степень структурного сходства с гомологами из бактерий и эукариот. Однако, имеющиеся изменения приводят к расширению субстратной специфичности у трансаминаз разветвленных L-аминокислот из архей *T. uzoniensis* и *V. moutnovskia* и к появлению дополнительной активности с первичными (R)-аминами у трансаминаз из бактерий *T. terrenum* и *H. ochraceum*, что, однако, не приводит к снижению активности этих ферментов по отношению специфических субстратов. В работе подробно описаны результаты по сравнению активности ферментов относительно большого числа субстратов, проанализирована структура активных центров и предложены возможные объяснения наблюдаемых эффектов на структурном уровне.

Очевидно, что Екатериной Юрьевной проделана огромная научная работа, как экспериментальная, так и теоретическая. У меня нет существенных замечаний ни по самой работе, ни по её оформлению. На мой взгляд, и эксперимент, и их описание и анализ проведен на очень высоком уровне.

Диссертационная работа Безсудновой Екатерины Юрьевны «Взаимосвязь структуры и функции ферментов из термофильных организмов на примере дегидрогеназ и трансаминаз» является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, по которой опубликовано 22 статьи, в том числе в ведущих по данной теме международных изданиях (10 публикаций в журнале Q1(SJR)). По актуальности темы, методологии, объёму и новизне экспериментальных данных, их научно-практической значимости,

публикациям диссертационная работа Безсудновой Е.Ю. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология» и 02.00.10 «Биоорганическая химия»

Никулин Алексей Донатович

22 апреля 2022 г.

Подпись д.х.н. Алексея Донатовича Никулина заверяю

ученый секретарь Института белка РАН

к.б.н. Никонова Екатерина Юрьевна

22 апреля 2022 г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
белка Российской академии наук

142290 Московская область, г. Пущино-ул. Институтская, 4 Институт
белка РАН