

Отзыв официального оппонента на диссертацию Е. Ю. Безсудновой
«Взаимосвязь структуры и функции ферментов
из термофильных организмов на примере дегидрогеназ и трансминаз»,
представленную на соискание ученой степени доктора химических наук
по специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность диссертационной работы Е. Ю. Безсудновой не вызывает сомнений, поскольку понимание структурных факторов, обеспечивающих ферментативный катализ, является одной из основных задач фундаментальной энзимологии. От понимания взаимосвязи структура – функция ферментов во многом зависит создание новых биотехнологических процессов с применением ферментов.

Объектами исследований являлись дегидрогеназы и трансминазы из архей и термофильных бактерий. Хотя ферменты этих двух классов интенсивно изучаются, до сих пор исследования проводились в основном для ферментов из мезофильных микроорганизмов, а ферменты из экстремофильных организмов и архей изучены значительно меньше, хотя они представляют несомненный интерес для прикладной энзимологии.

В результате отбора дегидрогеназ и трансминаз из геномов архей и термофильных микроорганизмов объектами исследований стали: оксидоредуктазы из гипертермофильной бактерии *T. sibiricus* и гипертермофильной археи *Pyrobaculum ferrireducens* и трансминазы из гипертермофильных архей *Thermoproteus uzoniensis*, *Vulcanisaeta moutnovskia* и *Geoglobus acetivorans* и термофильных бактерий *Thermobaculum terrenum* и *Haliangium ochraceum*.

Для короткоцепочечной NADP-зависимой алкогольдегидрогеназы из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus* была установлена очень широкая субстратная специфичность в реакциях окисления и восстановления, особенно в реакции окисления, где субстратами оказались 15 спиртов и три сахара. Замечательной особенностью этого фермента оказались его исключительная термостабильность и сохранение активности в высоких концентрациях органических растворителей и NaCl. Решение пространственной структуры алкогольдегидрогеназы и ее анализ позволили установить особенности структуры, обеспечивающие уникальные свойства фермента. Также с этой целью структурные характеристики *Thermococcus sibiricus* алкогольдегидрогеназы были сравнены с характеристиками дегидрогеназы из двух термофильных и двух мезофильных микроорганизмов. Для фермента из *Thermococcus sibiricus* отличительными характеристиками оказались наибольшая плотность водородных связей и их распределение в молекуле и разветвленная сеть солевых мостиков на поверхности глобулы фермента. Анализ структуры

позволил объяснить особенности влияния мочевины, гидрохлорида гуанидина и NaCl на активность алкогольдегидрогеназы.

Для термостабильной альдегиддегидрогеназы из гипертермофильной археи *Pyrobaculum ferrireducens* были определены стационарные кинетические параметры в реакциях с тремя субстратами и решены 5 трехмерных структур - три структуры холофермента, структура апофермента и структура комплекса с изобутиральдегидом.

Структуры были проанализированы в сравнении со структурами гомологичных ферментов из мезофильных микроорганизмов. Интересно отметить, что в трех структурах альдегиддегидрогеназы обнаружены разные конформации трех участков активного центра – никотиамидного фрагмента кофермента, остатков Cys287 и Glu253, комбинация этих конформаций соответствует интермедиатам ферментативной реакции. Для фермента установлено, что связывание аденинового фрагмента кофермента оказалось принципиально отличным от связывания кофермента в короткоцепочечной NADP-зависимой алкогольдегидрогеназы из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus*. Анализ структурных особенностей, важных для обеспечения термостабильности фермента, позволил предположить, что сокращение числа сквозных карманов в тетрамерной молекуле фермента может вносить вклад в его термостабильность. Сравнительный анализ распределения заряженных остатков аминокислот и распределение трех типов водородных связей в тетрамере фермента из *Pyrobaculum ferrireducens* и из мезофильных микроорганизмов показал, что основным фактором температурной устойчивости альдегиддегидрогеназы из *Pyrobaculum ferrireducens* являются внутренние водородные связи и водородные связи между заряженными и нейтральными атомами и доля последних превалирует в общем количестве внутренних водородных связей. В этой части работы хочется отметить, что анализ трехмерной структуры альдегиддегидрогеназы из *Pyrobaculum ferrireducens* в сравнении со структурами нескольких оксидоредуктаз позволил выявить новый для этого фермента путь вывода протона, т.е., полученные результаты позволили детализировать механизм ферментативной реакции (стр. 155, раздел 3.2.7).

В целом, оригинальные результаты, полученные для оксидоредуктаз из термофильных микроорганизмов и архей, позволили установить факторы, обеспечивающие термостабильность этих ферментов и их устойчивость к органическим и неорганическим денатурирующим агентам. Помимо вклада в понимание тонких закономерностей структура – функция ферментов, полученные результаты важны для разработки промышленных дегидрогеназ, могущих использоваться для синтеза оптически чистых спиртов и в мультиферментных биотехнологических процессах.

Далее в диссертационной работе были исследованы три рекомбинантные трансаминазы из архей и две рекомбинантные трансаминазы из бактерий. Выбранные трансаминазы принадлежат к семейству пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых трансаминаз с типом укладки полипептидной цепи IV, ферменты этого семейства относительно мало исследованы по сравнению с трансаминазами I-го типа. Используемый Е.Ю. Безсудновой оригинальный алгоритм обнаружения новых трансаминаз по изменениям в характеристических мотивах, известных для ферментов IV-го типа укладки полипептидной цепи, привел к идентификации трансаминаз со значительными отличиями в организации их активных центров, что вносит вклад в понимание закономерности структура – функция в пиридоксаль-5'-фосфат-зависимом катализе.

Определение кинетических параметров трансаминаз (стр. 165, таблица 3.15) заложило необходимый фундамент для дальнейших исследований каталитических механизмов катализируемых ими реакций, в том числе с применением методов быстрой кинетики. Для ферментов была показана весьма широкая субстратная специфичность (стр. 163, таблица 3.13), при этом две трансаминазы из архей использовали как субстраты серусодержащие аминокислоты и лизин, аргинин и гистидин, что до сих пор не наблюдалось для трансаминаз, катализирующих реакцию переноса аминокислоты от аминокислот с разветвленной боковой цепью (далее - «канонические трансаминазы»). Кроме того, новым фактом субстратной специфичности для двух ферментов из *Thermoproteus uzoniensis* и из *Vulcanisaeta moutnovskia* оказалось то, что для них α -кетоглутарат не был субстратом, им оказался 2-оксобутират, что отличает эти трансаминазы от канонических трансаминаз. Полученные в работе каталитические характеристики новых трансаминаз являются оригинальными и определены как для полной ферментативной реакции так и для полуреакции.

Кристаллическая структура рекомбинантной трансаминазы из *Thermoproteus uzoniensis*, определенная при выполнении диссертационной работы, явилась первой структурой трансаминазы из архей. В работе проведен тщательный анализ структуры, позволивший найти в активном центре фермента (в O-кармане активного центра) отличия от аминокислотной последовательности и конформации активных центров, характерных для канонических трансаминаз, что, по всей вероятности, приводит к обнаруженному в работе отсутствию активности в реакции с α -кетоглутаратом. Анализ структуры также позволил предположить, какие особенности структуры в O-кармане активного центра трансаминаз из архей обеспечивают найденную в работе новую субстратную специфичность трансаминаз, а именно, возможность этих ферментов связывать положительно заряженные аминокислоты.

Интересно отметить, что для фермента из *Geoglobus acetivorans* в O-кармане активного центра присутствовал именно канонический мотив, в силу чего для этой трансаминазы из архей

не была найдена активность в реакции с положительно заряженными аминокислотами и фермент использует α -кетоглутарат как субстрат, что подтверждает правомочность вывода, сделанного диссертантом для трансаминаз из *Thermoproteus uzoniensis* и из *Vulcanisaeta moutnovskia* об особенностях их О-кармана, обеспечивающих связывание аминокислот с положительно заряженными боковыми группами и отсутствие связывания α -кетоглутарата.

Поскольку трансаминаза из *Geoglobus acetivorans* использовала α -кетоглутарат как акцептор аминокислотной группы, в работе были определены пространственные структуры холофермента и его комплекса с α -кетоглутаратом. Анализ структуры выявил в Р-кармане фермента два центра связывания карбоксильных групп кетосубстрата и конформационные изменения при его связывании, приводящие к закрытию активного центра фермента.

В целом, анализ кристаллических структур трех трансаминаз из архей показал, что организация их активных центров гомологична таковой для трансаминаз из мезофильных организмов, катализирующих реакцию трансаминирования аминокислот с разветвленной боковой цепью, и позволил объяснить особенности организации активных центров трансаминаз из *Thermoproteus uzoniensis* и из *Vulcanisaeta moutnovskia*, приводящие к не известной ранее для трансаминаз из мезофильных микроорганизмов активности в реакции с аминокислотами с положительно заряженными боковыми группами.

Характеристические мотивы двух трансаминаз из термофильных бактерий *Thermobaculum terrenum* (далее фермент обозначается как «ТаТТ») и *Haliangium ochraceum* (обозначается как «НО3033») заметно отличались (стр. 186, таблица 3.18) от мотивов канонических трансаминаз, использующих как субстраты аминокислоты с разветвленной боковой цепью или амины (далее амины далее упоминаются как «R-ТА»). В случае НО3033 аминокислотами были первичные амины, а акцептором аминокислотной группы оказался не пируват, как для канонических R-ТА, а кетоаналоги аминокислот с разветвленной боковой группой. Для фермента субстратная специфичность исследована в полной реакции и в полуреакции и установлено, что он стерео- и региоспецифичен. В полной реакции рН-оптимум активности НО3033 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 нереакционноспособной».

Не совсем понятно, что имеется в виду под реакционной формой фермента. Для нуклеофильной атаки аминогруппы субстрата на С4'-атом кофермента (т.е. для образования внешнего альдимины) требуется непротонированная аминогруппа аминокислоты и наличие протонированного атома азота альдимины, что повышет электрофильность С4'-атома кофермента, способствуя нуклеофильной атаке аминогруппы. 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 Шиффа участвуют депротонированная группа аминокислоты и форма кофермента с протонированным атомом азота внутреннего альдимины.

Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые ферменты, благодаря коферменту, обладают уникальными спектральными характеристиками, позволяющими определить как ионные и таутомерные формы их внутренних альдиминов так и химическую структуру и ионные и таутомерные формы интермедиатов катализируемых ими реакций. Ионную форму внутреннего альдимины НО3033 в рН-оптимуме можно было определить спектрофотометрически.

Кристаллическая структура НО3033 была определена с разрешением 2.35 Å. В гомодимерной молекуле, как и в молекулах канонических трансаминаз, каждая субъединица состоит из двух доменов, активный центр фермента состоит из О- и Р-карманов. Детальный анализ структуры в сравнении со структурами канонической трансаминазы из *E-coli* и трансаминазы из *Arthobacter sp.*, позволил выявить особенности составов О- и Р-карманов, обеспечивающие связывание как аминокислот с разветвленной боковой группой так и первичных аминов и катализирующие оба типа трансаминирования.

Интересным ферментом с точки зрения субстратной специфичности оказалась термостабильная ТаТТ. Установлено, что фермент катализирует реакцию трансаминирования с типичными субстратами канонических трансаминаз IV-го типа, с типичными субстратами - R-ТА и обнаруженную для неё уникальную реакцию переноса аминогруппы от первичных аминов на α-кетоглутарат. ТаТТ наиболее эффективно катализирует перенос аминогруппы аминокислот с разветвленной боковой цепью на α-кетоглутарат, наилучшим субстратом среди аминов оказался (R)-(+)-1-фенилэтиламин. Для фермента определены трехмерные структуры холоферментов - с пиридоксаль-5'-фосфатом и пиридоксамин-5'-фосфатом. Гексамерная структура ТаТТ рассматривается как тример димеров, в каждом из димеров активные центры

образованы остатками из соседнего мономера. В диссертационной работе поведен тщательный анализ остатков активного центра фермента, позволивший выявить, какие отличия, по сравнению с каноническими трансаминазами, имеющиеся в активном центре ТаГТ, приводят к смешенному типу активности этого фермента. Как новый и интересный результат, полученный в этой части работы, следует отметить, что активности фермента (в реакции с аминокислотами и аминами) оказались не взаимоисключающими. Полученные предположения о возможной роли остатков активного центра были проверены методом сайт-направленного мутагенеза. Одной из целей сайт-направленного мутагенеза было улучшить специфичность фермента в реакции с первичными аминами. В работе получены и исследованы несколько форм фермента, содержащих как одиночные замены остатков активного центра, так и двойные, тройные и четверные замены (стр. 210, таблица 3.25). Для формы, содержащей тройную замену, каталитическая эффективность мутантной формы в полуреакции оказалась повышенной по сравнению с ферментом дикого типа в 66 раз, для формы, содержащей четверную замену, каталитическая эффективность мутантной формы оказалась повышенной 100 раз. Для объяснения полученного эффекта были определены пространственные структуры двух мутантных форм. Для обеих мутантных форм введение замен повлияло на положение О-петли и контакты между остатками петли и остатками, находящимися в Р-кармане и в междоменной петле. Анализ структур показал, что остатки О-петли образуют множественные контакты с кетосубстратом, что и обеспечивает его эффективное связывание.

Суммируя полученные при исследовании ТаГТ результаты, автор делает вывод, что природа широкой субстратной специфичности фермента обусловлена уникальной комбинацией гидрофобных остатков активного центра и особенностями О-петли – её положением и аминокислотным составом, создающим специфичные для этого фермента взаимодействия с соседними остатками.

Для изучаемых в диссертационной работе трансаминаз, учитывая их прикладной потенциал, исследованы термостабильность и эффекты органических растворителей. Полученные данные позволили Е.Ю. Безсудновой сделать правомерное заключение, что основным фактором, обеспечивающим термостабильность трансаминаз, является организация их тетрамерных молекул. Как результат проведенных исследований, трансаминазу ТаГТ предложено рассматривать в качестве кандидата для создания биокатализатора стереоселективного синтеза оптически чистых аминокислот и аминов.

Работа Е. Ю. Безсудновой выполнена с применением большого количества современных методов физико-химической биологии и демонстрирует высокие экспериментальный и теоретический уровни автора. Можно отметить, что исследование активности выбранных ферментов являлось не тривиальной задачей из-за широких субстратной и реакционной

специфичностей трансаминаз и отсутствия у субстратов и продуктов спектральных свойств. Это потребовало разработки нескольких методов определения активности ферментов, что, возможно, явилось одной из скорость-лимитирующих стадий при исследовании трансаминаз.

Работа Е.Ю. Безсудновой написана грамотным языком и тщательно оформлена. Например, можно отметить хорошую иллюстрацию кристаллических структур с различной окраской элементов структур. Обзор литературы непосредственно связан с темой работы.

Приоритетные результаты диссертационной работы Е.Ю. Безсудновой следует рассматривать как научное достижение. Полученные в работе данные опубликованы в ведущих отечественных и зарубежных журналах, неоднократно представлены на конференциях. Автореферат полно отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа Е.Ю. Безсудновой 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.

Доктор химических наук по специальности 03.00.03 Молекулярная биология

Главный научный сотрудник

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки

Институт молекулярной биологии

им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук,

профессор



Татьяна Викторовна Демидкина

119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32

тел: +74991359858,

e-mail: tvdemidkina@yandex.ru

28 апреля 2022 г

Татьяна Викторовна Демидкина
Уполномоченная секретарь ИМБ РАН

Демидкина Т.В.

