

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

Современный биокатализ включает как исследование ферментов, так и огромную практическую составляющую: применение ферментов и микроорганизмов для целей синтетической химии. Исследование взаимосвязи *последовательность-структура-функция* в ферментах является неотъемлемой частью современного биокатализа, которое открывает возможности изменять свойства ферментов, регулировать ферментативные процессы и в результате включать катализируемые ферментами реакции в биотехнологические схемы.

Применение ферментов для целей биотехнологии исходно ограничено необходимостью соблюдать оптимальные условия для стабильности фермента, ограничения также накладывают специфичность фермента и условия каталитической реакции. Для результативной оптимизации биокатализатора необходимы представления о структурных факторах и мотивах последовательностей, которые отвечают за определенные характеристики и свойства фермента. И здесь возможности исследователя нередко ограничены недостаточным пониманием структурных основ субстратной специфичности, стабильности и каталитической эффективности фермента-биокатализатора. Накопление знаний в области взаимосвязи *последовательность-структура-функция* позволяет преодолеть эти сложности и эффективнее предсказывать результаты изменений в последовательности белка или, в обратную сторону, иметь возможность сделать направленные изменения в ферменте под конкретную практическую задачу.

Ферменты из архей безусловно представляют интерес для целей биотехнологии и фундаментальной науки, потому что активны и стабильны в

экстремальных условиях (высокие и низкие температуры, высокая соленость, кислые и щелочные значения рН и т.д.). Их изучение позволяет расширять наши представления о молекулярных основах стабильности ферментов, о разнообразии ферментов, их адаптация в средах с неблагоприятными факторами делает их перспективными объектами для применения в биотехнологических схемах.

Исследование Безсудновой Е.Ю., нацеленное на анализ взаимосвязи структуры и функции в ферментах из архей и термофильных бактерий, несомненно является актуальным в контексте текущих задач биокатализа и неуклонного внедрения последнего в самые разные сферы химического производства. Выбранные объекты исследования – термостабильные дегидрогеназы и трансаминазы – наилучшим образом соответствуют проблематике исследования, так как являются перспективными биокатализаторами синтеза оптически активных соединений.

Научная новизна и практическая значимость работы состоит в исследовании новых ферментов из архей. Алкогольдегидрогеназа из археи *Thermococcus sibiricus* отличается рекордными параметрами термостабильности, исследование структурных факторов термостабильности этого фермента и влияния добавок на активность этого фермента при высоких температурах позволило наметить подходы к регуляции его активности. В ходе работы на основании исследований алкогольдегидрогеназы из *Thermococcus sibiricus* и трансаминазы из термофильной бактерии *Thermobaculum terrenum* сделаны обобщающие заключения о регуляции активности термостабильных ферментов при субоптимальных температурах.

Трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена из архей впервые детально охарактеризованы именно в работе Безсудновой Е.Ю. Составлены структурно-функциональные характеристики архейных PLP-зависимых трансаминаз разветвленных L-аминокислот из трех гипертермофильных архей. На основании проведенных исследований сделан обобщающий вывод

о сходном устройстве активного центра у трансаминаз разветвленных L-аминокислот из архей, бактерий и эукариот.

В работе детально исследованы трансаминазы со смешанным типом активности, обнаруженные в результате оригинального алгоритма поиска новых трансаминаз по изменениям в характеристических мотивах. На примере таких трансаминаз из бактерий *Thermobaculum terrenum* и *Haliangium ochraceum* впервые показано, что у PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки активности с L-аминокислотами и первичными (R)-аминами не являются взаимоисключающими.

Вышесказанное обосновывает безусловную актуальность работы, а разнообразие объектов свидетельствует о масштабном подходе к проблеме исследования.

В работе автором были поставлены следующие задачи:

1. Составить структурно-функциональную характеристику супертермостабильной алкогольдегидрогеназы из археи *Thermococcus sibiricus*. Провести поиск структурных факторов, определяющих стабильность фермента.
2. Получить структуры холоформы и комплекса с субстратом альдегиддегидрогеназы из гипертермофильной археи *Pyrobaculum ferrireducens* (*Pyrobaculum sp.1860*). Провести анализ состояний активного центра и поиск структурных факторов, определяющих стабильность фермента.
3. Составить структурно-функциональные характеристики трансаминаз из архей, специфичных к разветвленным L-аминокислотам, и сравнить их свойства со свойствами гомологичных бактериальных трансаминаз.
4. Определить варианты характеристических мотивов в последовательностях трансаминаз IV-типа укладки PLP-связывающего домена из архей и бактерий. Отобрать трансаминазы с новыми характеристическими мотивами для дальнейшего исследования.

5. Охарактеризовать структуры и свойства трансаминаз IV-типа укладки PLP-связывающего домена с новыми характеристическими мотивами.

Забегая вперед, можно с уверенностью сказать, что они были решены диссертантом в полном объеме

Диссертация построена по классической схеме: введение, обзор литературы, методическая часть и главы «результаты и обсуждение», заключение, выводы и список цитируемой литературы

Во введении автор достаточно четко описал место предлагаемого исследования среди основных направлений развития современного биокатализа и поставил задачи исследования. Литобзор написан хорошим языком, в нем подробно раскрыты свойства ферментов из экстремофильных организмов, а также свойства перспективных для биотехнологии дегидрогеназ и трансаминаз.

Методическая часть написана подробно. Этот раздел хорошо структурирован и дает исчерпывающее представление о методах, с использованием которых были получены результаты работы.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает шесть глав, посвященных детальной характеристике разных ферментов.

Раздел 3.1 «Короткоцепочечная NADP-зависимая алкогольдегидрогеназа из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus* (TsAdh319)» хорошо иллюстрирован и понятно описывает свойства и особенности структуры супертермостабильной алкогольдегидрогеназы. Предложенный автором метод анализа водородных связей позволяет наглядно продемонстрировать вклад водородных связей и заряженных остатков в стабилизацию структуры.

В разделе 3.2 «Альдегиддегидрогеназа из гипертермофильной археи *Pyrobaculum ferrireducens* (AIDHPyr1147)» детально описано строение активного центра архейной альдегиддегидрогеназы и рассмотрены структурный факторы ее термостабильности.

В разделе 3.3. «Трансаминазы из гипертермофильных архей *Thermoproteus uzoniensis*, *Vulcanisaeta moutnovskia* и *Geoglobus acetivorans*» представлена структурно-функциональная характеристика трансаминаз из гипертермофильных архей. Раздел хорошо иллюстрирован и дает представление о свойствах, термостабильности и устройстве активного центра у архейных трансаминаз.

Раздел 3.4. «Характеристические мотивы трансаминаз. Трансаминазы со смешанным типом активности» посвящен проведенному анализу характеристических мотивов трансаминаз. На основе этого анализа были отобраны две трансаминазы с новыми характеристическими мотивами для последующего анализа.

Раздел 3.5. «Трансаминазы со смешанным типом активности из бактерий *Haliangium ochraceum* и *Thermobaculum terrenum*» включает анализ двух трансаминаз, отличающихся новым для трансаминаз IV типа PLP укладки смешанным типом активности.

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)-аминами. 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 Снела, успешно дополняющим работы Александр 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 В6-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 В6-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. Высказанные замечания являются пожеланием автору для дальнейшего развития сформированного им направления и не могут быть рассмотрены , как принципиальные.

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.

Доктор химических наук по специальности 03.01.03 Молекулярная биология,
профессор, академик РАН, директор ИБХ РАН



Габибов Александр Габирович

25.04.2022

Подпись профессора Александра Габировича Габирова заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН, доктор физико-математических наук

Владимир Александрович Олейников



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биоорганической химии

имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук (ИБХ РАН)

117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

+74957273860

gabibov@mx.ibch.ru