



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

Mer. от 28.10.2024 № 12312-13/433



«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора ИМБ РАН
Член-корреспондент РАН

В.А. Митькевич
«28» октября 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Бакуновой Алины Константиновны** «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*: каталитические свойства и структура», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы исследования

Современный органический синтез невозможно представить без применения ферментов и микроорганизмов для целей синтетической химии и промышленности. Среди биотехнологически значимых ферментов пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые (PLP-зависимые) трансаминазы успешно зарекомендовали себя в стереоселективном аминировании органических соединений, и особенно при получении энантиомерно чистых продуктов. Стереоселективность аминирования природных трансаминаз достигает 99,9%, но они различаются набором субстратов с amino- и кетогруппой, и в большинстве своём узкоспецифичны. Несмотря на успехи в области белковой инженерии, изменение субстратной специфичности трансаминаз для целей синтеза неприродного органического соединения остается нетривиальной задачей. Другие ограничения на применение трансаминаз могут накладываться температурным режимом, концентрацией протонов в среде, присутствием органических растворителей, а также возможна деактивация трансаминаз через накопление неактивной апоформы и ингибирование субстратами. В связи с этим исследования новых трансаминаз актуальны для понимания природы субстратной специфичности и преодоления функциональных ограничений, а подходы к оптимизации свойств

фермента и стабилизации в реакционных условиях необходимы для нужд биотехнологии.

Целью диссертационной работы Бакуновой А.К. стало исследование взаимосвязи структуры и функции трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*, характеризующейся неканонической организацией активного центра. Объект исследования с такой структурой центра позволил получить новые результаты по высокой каталитической эффективности реакции трансаминирования с его участием, показать высокую стереоселективность и широкую субстратную специфичность трансаминазы. Объект исследования относится к трансаминазе IV типа укладки PLP-связывающего домена, в котором выделяют семейство трансаминаз D-аминокислот (DATA). Известно, что DATA катализируют стереоселективный обратимый перенос аминогруппы с D-аминокислоты на α -кетокислоту с образованием новых D-аминокислоты и α -кетокислоты. Однако природное разнообразие DATA позволяет проявлять дополнительную активность в отношении первичных (*R*)-аминов, в случае их связывания с субстратами D-аминокислот в одном активном центре, что в перспективе позволяет синтезировать не только оптически чистые D-аминокислоты, но и более сложные молекулы. На момент постановки задачи и выполнения диссертационной работы данные активности не были известны для белка из *H. hydrossis*, а предложенный механизм требовал подтверждения.

Таким образом, получив в ходе диссертационной работы рекомбинантную трансаминазу из *H. hydrossis*, которой автор дал сокращение TA_Halhy и проанализировав ее функциональные свойства и структуру активного центра полученных кристаллов, удалось впервые оценить возможность её применения в синтезе оптически чистых D-аминокислот и родственных молекул.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, принятой для диссертаций на соискание степени кандидата наук, и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, содержит заключение, выводы и списки опубликованных работ по теме диссертации и цитируемой литературы, включающий 240 литературных источников. Работа изложена на 131 странице.

Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследований и логически связаны друг с другом.

В работе поставлены 5 основных задач, по которым сформулированы 5 положений, выносимых на защиту, полностью отражающих эти задачи. По результатам диссертационной работы сформулированы 5 выводов, которые соответствуют сформулированным целям и задачам исследования. Выносимые положения подтверждаются результатами работы и являются научно обоснованными и практически значимыми. Диссертация представляет собой законченную работу, автореферат диссертационной работы и опубликованные автором научные труды в достаточной мере отражают содержание диссертации.

Содержание диссертации

Во Введении автор отмечает актуальность темы исследования, четко формулирует цель и задачи, описывает научную новизну, теоретическое и практическое значение результатов, и приводит список положений, выносимых на защиту. Приводятся сведения об апробации работы на научных конференциях и в печатных работах, опубликованных по теме диссертации.

Глава Обзор литературы начинается с описания молекулярных основ пиридоксалевого катализа, где автором приводятся все необходимые для понимания диссертационной работы данные об ионизационных формах, спектральных свойствах пиридоксаль-5'-фосфата в активном центре белка, а также его производных. Подробно рассмотрены современные представления о механизме ферментативного трансаминирования. Следующая часть литературного обзора включает детальное описание структуры и организации активного центра трансаминаз. Приведены особенности трехмерной укладки молекулы фермента, систематизированы данные по аминокислотному составу структурных элементов, образующих активный центр трансаминаз IV типа укладки. Хотелось особо отметить полезное дополнение по приведению этих характеристик в табличный вид из множества литературных источников, позволяющий наглядно оценить природу двойственного субстратного узнавания и ответственные за этот феномен структурные мотивы. В качестве классического ингибитора ферментов класса DATA рассмотрен механизм взаимодействия трансаминаз с D-циклосерином, который ещё будет фигурировать в диссертационном исследовании применительно к ингибированию TA_Halhy. Последний раздел содержит сведения о современном состоянии биокатализа и применении трансаминаз для целей синтетической химии. Обзор литературы отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, написан логично и 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*, и дано подробное описание методов исследования. В частности, методов клонирования, мутагенеза, экспрессии целевых ферментов, методов выделения и очистки белков при помощи различных типов хроматографии, и методов определения активности трансаминазы. После выделения белков Бакуновой А.К. проведён полный комплекс методов для охарактеризации кинетических, термодинамических и структурных свойств: предстационарная кинетика исследована с помощью метода «остановленного потока»; связывание кофактора с трансаминазой и её вариантами оценено с помощью флуоресцентного титрования; термостабильность и взаимодействие с ингибитором изучено с помощью спектральных и кинетических методов по остаточной активности белка. Полученные кристаллы белка позволили совместно с коллегами в Институте провести анализ рентгеноструктурных данных для описания структуры активного центра. Приведенные описания методов изложены достаточно подробно для воспроизведения результатов.

Глава Результаты и их обсуждения является центральной частью диссертационной работы и разделена на пять подглав. Для полученной рекомбинантной формы трансаминазы из бактерии *H. hydroxys* автором проведена подробная функциональная характеристика: изучены различные доноры аминокислот, определены оптимальные условия и кинетические параметры реакций трансаминирования, исследована предстационарная кинетика, идентифицированы интермедиаты. На следующем этапе работы проведена кристаллизация, определена и проанализирована пространственная структура трансаминазы из *H. hydroxys* в холоформе и в комплексе с ингибитором. На основе выводов из обзора литературы автором была предложена гипотеза о роли остатков аргинина в функционировании трансаминазы, и отдельно хочется выделить, что в ходе работы был получен и охарактеризован ряд вариантов с одиночными аминокислотными заменами. Анализ вариантов включал субстратную специфичность, стабильность и аффинность к кофактору. Данные эксперименты принципиально подкрепляют теоретические положения. Проведенная кристаллизация фермента позволила проанализировать пространственную структуру одного из вариантов в холоформе и в комплексе с аналогом субстрата. С помощью этого автором выявлена сеть нековалентных взаимодействий с остатками R28* и R90, стабилизирующих молекулу 5'-пиридоксальфосфата в активном центре TA_Nalhy. Часть из выявленных

взаимодействий оказалась консервативной и в случае других DATA с неканонической организацией активного центра. Подробно с помощью спектральных методов анализа и кристаллографии было изучено взаимодействие трансаминазы TA_Nalhy с ингибитором D-циклосерином, в результате чего показана обратимость его ингибирования и предложен механизм обратимости. Таким образом, выявленная для этого фермента и других разнообразных пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов обратимость ингибирования D-циклосерином, несомненно, снижает перспективы этого соединения в роли антибактериального препарата. В завершающей части работы проанализирована возможность применения трансаминазы из *H. hydrossis* в качестве биокатализатора стереоселективного аминирования для синтеза оптически чистых D-аминокислот в различных условиях на примере 10 субстратов. Нестабильность холофермента негативно сказывалась на выходе целевого продукта, но диссертантом определены факторы, стабилизирующие холофермент в реакционных условиях, и предложены подходы к полной реактивации холофермента.

В разделе Заключение сделано обобщение всех полученных результатов и предложены выводы по структурно-функциональной организации белка.

Представленные в диссертации экспериментальные результаты получены с применением современных и эффективных методов и, несомненно, свидетельствуют о том, что поставленные автором задачи были успешно решены. Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов соответствует полученному объему экспериментального материала, а также обоснованно подтверждена комплексом современных биохимических, структурных, и статистических методов.

Научная новизна

Выбор объекта диссертационного исследования обусловлен найденной при полногеномном поиске в бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* последовательности новой трансаминазы D-аминокислот IV типа укладки PLP-связывающего домена, характеризующейся отличной от других трансаминаз организацией активного центра. В рамках работы данная трансаминаза была выделена, проведена её структурно-функциональная характеристика. Сочетание различных методов для исследования функции активного центра трансаминазы, ключевыми остатками которого являются три остатка аргинина и остаток лизина, показало многофункциональность аргинина и роль удаленных от кофактора аминокислотных остатков в стабилизации рабочей конформации PLP через сеть нековалентных

взаимодействий. Впервые был проведен детальный анализ предстационарной кинетики трансаминаз D-аминокислот методом «остановленного потока». Бакунова А.К. провела анализ полуреакций с D-аминокислотами, определив элементарные стадии катализа трансаминазами D-аминокислот и кинетические факторы инактивации, также определила субстратную специфичность в реакции стереоселективного аминирования α -кетокислот среди десятка органических молекул.

Практическая значимость работы

В работе показана возможность применения новой трансаминазы из *H. hydroxylis* как биокатализатора в синтезе разнообразных ароматических и алифатических D-аминокислот с энантиомерным избытком более 99%. Обоснованы преимущества нового активного центра трансаминазы D-аминокислот, а именно: высокая каталитическая эффективность, стереоселективность и пластичность; подобраны условия 100% реактивации холофермента. Стоит отметить, что важной характеристикой трансаминаз и PLP-зависимых ферментов вообще является стабильность холофермента. Нестабильность холофермента негативно сказывается на выходе целевого продукта, поскольку приводит к накоплению менее стабильной и неактивной апоформы и, как следствие, остановке реакции. Получен вариант трансаминазы с единичной аминокислотной заменой с дополнительной активностью в реакциях с первичными (*R*)-аминами, определены структурные детерминанты активности трансаминаз D-аминокислот с субстратами как с α -карбоксильной группой, так и без неё, что, безусловно, является перспективным результатом для ферментного катализа в синтетической органической химии. Результаты диссертации дополняют теоретический базис как в области энзимологии и биохимии ферментов, так и в разработке биокатализаторов с заданной субстратной специфичностью. По результатам исследований в банк данных белковых структур (Protein Data Bank) депонированы пять структур (PDB коды 7P7X, 8AHU, 8RAF, 8RAI, 8YRT).

Апробация диссертации

Основные результаты диссертационной работы отражены в публикациях. По теме работы опубликовано 5 статей в международных рецензируемых журналах. Результаты работы представлены на российских и международных конференциях: XV Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (г. Саратов, 2021); VI Съезд биохимиков России (г. Дагомыс, 2022); 13th BGRS/SB (г.

Новосибирск, 2022); 7th International Conference on Novel Enzymes (г. Грайфсвальд, Германия, 2023); 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применение» (г. Суздаль, 2023); X Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (г. Москва, 2024).

Замечания и вопросы

В целом, диссертационное исследование Бакуновой А.К. изложено последовательно и целостно, результаты являются оригинальными и отражают как новизну данной работы, так и проявленное диссертантом высокое экспериментальное мастерство. Орфографических ошибок и опечаток в работе находится небольшое количество; часть опечаток можно отнести к разночтениям в терминологии – разнице англоязычного и русскоязычного дефисного/слитного написания ферментов (аспартат-аминотрансферазы (стр. 11), L-серин-глиоксалат-трансаминазы (стр. 15) и др.), но есть опечатки на рисунках:

- Рис. 1.4, на схеме полуреакций меняется схематическое обозначение лизинового аминокислотного остатка (убавляется CH_2 -фрагмент при аминокгруппе);

- Схема 1.7 использует сокращение DAAT вместо введенного в тексте DATA;

- Рис. 1.11 был адаптирован из недостоверного источника и содержит опечатки сразу в нескольких формулах – приведены неверные структуры Сакубитрила и Суворексанта; в формуле Вернаколанта не указан стереоцентр при эфирной связи с циклогексаном, и стереоцентр с ОН группой должен был обратным; аналогично у Гласдегиба не указан ещё один стереоцентр у пиперидина.

Терминология и детали отдельных моментов могли бы быть более чётко сформулированы. Достаточно часто в современной научной литературе встречается термин «мутантные формы фермента», вместо которого автор использовал синоним «варианты фермента». Из аналогичных пожеланий, подробнее описывать природу явления «утечки» кофермента, обычно не встречающейся у других ферментов пиридоксалевого катализа, где кофактор не склонен к такому поведению.

Данные замечания не носят принципиального характера, не подвергают сомнению корректность основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Заключение

Диссертационная работа Бакуновой А.К. «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydroxsis*: каталитические свойства и структура» представляет

собой целостное и завершенное исследование по актуальной теме, выполненное на высоком методологическом уровне, результаты которой имеют существенное значение для современной энзимологии, биохимии и структурной биологии.

Данная диссертационная работа соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями и дополнениями в последней редакции от 25.01.2024), предъявляемым к кандидатским диссертациям, и заслуживает высокой оценки, а автор диссертации, Бакунова Алина Константиновна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия.

Диссертационная работа Бакуновой А.К. «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*: каталитические свойства и структура», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, заслушана и утверждена на объединенном научном семинаре профильных лабораторий ИМБ РАН 15 октября 2024 г. (протокол №2)

Отзыв на диссертационную работу Бакуновой А.К. подготовлен ведущим научным сотрудником ИМБ РАН Сольевым Павлом Николаевичем.

Ведущий научный сотрудник
руководитель лаборатории химической регуляции биокатализа
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта РАН,
кандидат химических наук
по специальности 03.01.03. – Молекулярная биология



П.Н. Сольев

119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32
Тел.: +7(499)135-9858
E-mail: solyev@eimb.ru

Я, Сольев Павел Николаевич, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН и в Федеральной информационной системе государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело соискателя и дальнейшую обработку.

Подпись к.х.н. Сольева П.Н. удостоверяю
Ученый секретарь ИМБ РАН, к.ф.-м.н.
«28» октябре 2024 года




Сольев П.Н.



Коновалова Е.В.