

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01
ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА
БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 21 ноября 2024 г. № 17

о присуждении Бакуновой Алине Константиновне, гражданство Российская
Федерация, ученой степени кандидата химических наук

Диссертация «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*: каталитические свойства и структура» по специальности 1.5.4 Биохимия принята к защите 6 августа 2024 г. (протокол № 12) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк; от 10 февраля 2014 года № 55/нк; от 30.09.2015 №1166/нк; от 13 марта 2019 года № 222/нк; от 03.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. № 501/нк.

Соискатель:

Бакунова Алина Константиновна, 1995 года рождения, в 2019 году окончила Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с присвоением квалификации специалиста по специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия. С 2020 по 2024 гг. обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» по направлению 06.06.01 Биологические науки. С 2019 года и по настоящее время работает младшим научным сотрудником лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН».

Диссертация «Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*: каталитические свойства и структура» выполнялась в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы

биотехнологии» РАН».

Научный руководитель:

Безсуднова Екатерина Юрьевна, доктор химических наук, специальность 1.5.4. Биохимия, Ведущий научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии Института Биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Официальные оппоненты:

Шевцова Елена Феофановна, доктор химических наук, специальность 1.5.4. Биохимия, главный научный сотрудник, и.о. заведующей лабораторией биомолекулярного скрининга Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук.

Габдулхаков Азат Габдрахманович, кандидат физико-математических наук, специальность 1.5.2. Биофизика, ведущий научный сотрудник, руководитель группы структурных исследований макромолекулярных комплексов ФГБУН Институт белка Российской академии наук.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен тем, что

- доктор биологических наук, Шевцова Елена Феофановна является ведущим из отечественных специалистов в области изучения механизмов взаимодействия ферментов с ингибиторами и модуляторами;

- кандидат физико-математических наук Габдулхаков Азат Габдрахманович является одним из ведущих отечественных специалистов, изучающих структурно-функциональную связи белков и ферментов.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Бакуновой А.К.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) в своем положительном отзыве, подписанном кандидатом химических наук, руководителем лаборатории химических основ биокатализа, ведущим научным сотрудником Сольевым Павлом Николаевичем и утвержденном заместителем директора ИМБ РАН, член-корреспондентом РАН Владимиром Александровичем Митькевичем, указало, что диссертационная работа Бакуновой Алины Константиновны является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Бакунова А.К. заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что ФГБУН ИМБ РАН имени В.А. Энгельгардта является признанным научным отечественным центром и в своем

составе имеет несколько подразделений, занимающихся изучением функционирования ферментов, в том числе ферментов, зависящих от придоксаль-5'-фосфата. Таким образом, сотрудники ФГБУН ИМБ РАН имени В.А. Энгельгардта и, в частности, лаборатории химических основ биокатализа, являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, связанные с тематикой диссертационной работы Бакуновой А.К.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п.11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842.

1. Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T. V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Y. The uncommon active site of D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis*: biochemical and structural insights into the new enzyme // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26(16). – P. 1-18. IF 4,4.

2. Bakunova A.K., Isaikina T.Yu., Popov V.O., Bezudnova E.Yu. Asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic and aromatic D-amino acids catalyzed by transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Catalysts*. – 2022. – Vol. 12(12):1551. – P. 1-17. IF 4,1.

3. Bakunova A.K., Kostyukov A.A., Kuzmin V.A., Popov V.O., Bezudnova E.Yu. Mechanistic aspects of the transamination reactions catalyzed by D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2023. – Vol. 1871(2). – P 1-8. IF 4,1.

4. Бакунова А.К., Матюта И.О., Бойко К.М., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Механизм ингибирования D-циклосерином трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* // *Биохимия (Москва)*. – 2023. – Т. 88(5). – С. 841-853. IF 2,8.

5. Bakunova A.K., Matyuta I.O., Minyaev M.E., Isaikina T.Yu., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Yu. Multifunctionality of arginine residues in the active sites of non-canonical D-amino acid transaminases // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2024. – Vol. 756. – P. 1-10. IF 3,9.

Результаты работы также были представлены на 6 российских и международных конференциях и опубликованы в материалах конференций.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, главного научного сотрудника, и.о. заведующей лабораторией биомолекулярного скрининга Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук Шевцовой

Елены Феофановны (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы:

1. Есть ли в организме *H. hydrossis* другие ферменты, связанные с метаболизмом D-аминокислот? Известно ли что-то об их функции, или о функции их гомологов?

2. Для трансаминазы из *H. hydrossis*, как и для других трансаминаз, вы наблюдаете диссоциацию холофермента, что очевидно может быть проблемой при разработке биотехнологических технологий. Действительно ли у трансаминазы Halhu эта диссоциация больше, чем у ранее охарактеризованных трансаминаз D-аминокислот и тогда чем можно объяснить такую нестабильность холофермента и насколько, по вашему мнению, это снижает эффективность работы трансаминазы Halhu в клетке? Есть ли, помимо реактивации добавлением кофактора, пути снижения подобной нестабильности, в частности, используя обнаруженную вами возможность участия удаленных остатков аминокислот в стабилизации кофактора?

Отзыв официального оппонента кандидата физико-математических наук, ведущего научного сотрудника, руководителя группы структурных исследований макромолекулярных комплексов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук Габдулхакова Азата Габдрахмановича (положительный). Отзыв содержит следующее замечание:

1. Есть лишь одно лингвистическое замечание: во время чтения резало глаз сочетание «остаток аргинина» и т.д. На мой взгляд, лучше писать либо полностью «аминокислотный остаток аргинина», либо «боковая группа аргинина».

Отзыв ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) (положительный). Отзыв содержит следующие замечания:

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 аминогруппе);

- 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 OH 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.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Родиной Елены Валерьевны, кандидата химических наук, доцента кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет.

Зверевой Марии Эмильевны, доктора химических наук, заместителя декана по научной работе, профессора кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет. Отзыв содержит следующий вопрос:

1. В работе обсуждаются два обратимых ингибитора, аналоги субстратов - D-цикосерин и фенилгидразин. Предполагаю, что автором не были обнаружены необратимые ингибиторы TA_Nalhy. В связи с этим вопрос: известны ли необратимые ингибиторы трансминаз D-аминокислот?

Петровой Татьяны Евгеньевны, кандидата физико-математических наук, старшего научного сотрудника лаборатории кристаллографии макромолекул Института математических проблем биологии РАН, филиала ИМП имени М.В. Келдыша РАН.

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет.

Белогуровой Натальи Георгиевны, кандидата химических наук, доцента кафедры химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

В отзыве замечаний по оформлению и содержанию автореферата нет.

С вопросами выступали:

проф., д.х.н., Варламов В.П., Член-корр. РАН, проф., д.б.н. Гусев Н.Б., проф., д.б.н. Левицкий Д.И., д.б.н. Топунов А.Ф., д.б.н. Терешина В.М., д.б.н. Агафонов М.О., проф., д.х.н. Дзантиев Б.Б.

В дискуссии приняли участие:

проф., д.б.н. Левицкий Д.И., д.х.н. Хомутов А.Р., д.б.н. Агафонов М.О.,

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты:**

1. Трансаминаза из *H. hydrossis* является «быстрой» трансаминазой D-аминокислот, k_{cat} составляет $215 \pm 6 \text{ с}^{-1}$ в реакции между D-глутаматом и пируватом при 40 °С. Трансаминаза из *H. hydrossis* наиболее специфична к D-глутамату.

2. В полуреакции трансаминазы из *H. hydrossis* с D-аминокислотами определены стадии: (1) образования внешнего альдимины, (2) 1-3-переноса протона, (3) выхода продукта и PMP из активного центра с накоплением апофермента. Образование хиноидного интермедиата не зафиксировано.

3. Остатки R28* и R90 в активном центре трансаминазы из *H. hydrossis* многофункциональны, они участвуют в связывании субстратов, в стабилизации активной формы кофактора, в стабилизации функционального димера. Вариант R90I активен с ароматическими первичными (R)-аминами.

4. D-циклосерин является обратимым ингибитором трансаминазы из *H. hydrossis*. Полная реактивация фермента возможна при добавлении PLP благодаря выходу аддуктов PLP и D-циклосерина из активного центра и стабильности апофермента.

5. Трансаминаза из *H. hydrossis* эффективно катализирует синтез разнообразных ароматических и алифатических D-аминокислот из соответствующих α -кетокислот, энантиомерный избыток продукта D-аминокислоты превышает 99%.

Научная новизна работы:

Комплексный метод исследования взаимосвязи структуры и функции PLP-зависимой трансаминазы D-аминокислот из *H. hydrossis* позволил охарактеризовать новый активный центр, отличный от ранее охарактеризованных трансаминаз D-аминокислот. Обнаружены новые закономерности взаимосвязи структуры и функции трансаминаз. Впервые проведен детальный анализ предстационарной кинетики трансаминаз D-аминокислот. Полученные результаты представляют интерес с точки зрения фундаментального исследования взаимосвязи структуры и функции ферментов,

Практическая значимость работы:

Продемонстрирована возможность применения трансаминазы из *H. hydrossis* как биокатализатора синтеза разнообразных D-аминокислот с энантиомерным избытком более 99%. Также были определены факторы, стабилизирующие PLP в активном центре, предложены подходы к стабилизации холофермента в реакционных условиях и к 100% реактивации холофермента. В ходе исследований были депонированы пять структур в банк данных белковых структур. Полученные результаты представляют интерес с практической точки зрения применения трансаминаз D-аминокислот в синтетической химии и их направленной модификации.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны; достоверность полученных данных не вызывает сомнений;

выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя заключался:

