

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук  
Шиловой Софьи Александровны на тему: «Особенности организации  
активного центра неканонической трансаминазы D-аминокислот из  
*Aminobacterium colombiense*» по специальности 1.5.4 Биохимия

Диссертационная работа Шиловой Софьи Александровны посвящена решению фундаментальной проблемы энзимологии – определению соотношения между структурой и функцией ферментов – на примере исследования структурных основ субстратной специфичности трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense*. Поскольку трансаминазы D-аминокислот перспективны как биокатализаторы (R)-селективного аминирования прохиральных  $\alpha$ -кетокислот, работа имеет очевидное биотехнологическое значение для получения оптически чистых D-аминокислот, которые также являются структурными блоками соединений, применяемых в пищевой, аграрной, фармацевтической и других химических отраслях. Проведенная в работе расшифровка взаимосвязи структуры активного центра и субстратной специфичности трансаминазы D-аминокислот необходима для создания эффективных биокатализаторов с заданными свойствами. В связи с известной ролью D-аминокислот как регуляторов функций мозга животных и современными исследованиями влияния кишечной микрофлоры на мозговую деятельность, включая когнитивные и психические дисфункции, характеристика ДААТ микроорганизмов может иметь не только биотехнологическое, но и медицинское значение. Актуальность работы, таким образом, не вызывает сомнений.

Работа С.А. Шиловой построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть с описанием материалов и методов исследования, основная часть с описанием полученных результатов и их обсуждением, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Во введении обоснована актуальность, новизна, практическая и теоретическая значимость выбранной темы, определена цель исследования и поставлены четкие задачи для ее выполнения. Раскрыты положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы С.А. Шилова рассмотрела публикации по затронутым в ее работе аспектам. В первой части обзора систематизированы основные группы трансаминаз, их структурные и функциональные особенности; проанализирована информация по механизму катализа; детально рассмотрена взаимосвязь между строением активного центра и узнаванием субстратов. Во второй части обзора рассмотрены история и современное состояние промышленного биокатализа, а также подходы к применению трансаминаз для получения оптически чистых аминов.

В экспериментальной части описаны использованные С.А. Шиловой методы получения и характеристики трансаминазы из *A. colombiense* и ее мутантных форм. Спектр использованных методов охватывает генно-инженерные подходы для получения рекомбинантных белков, хроматографическое разделение белков и низкомолекулярных продуктов реакций, различные подходы для характеристики каталитических свойств трансаминаз, включая спектроскопический анализ взаимодействия ферментов с кофактором и ингибиторами, рентгеноструктурный анализ для определения пространственных структур белков, биоинформатические методы анализа белковых структур и соотношений между структурой и функцией. Таким образом, в работе использован широкий и взаимодополняющий спектр современных методов исследования ферментов.

Глава «Результаты и их обсуждения» содержит значительный объем экспериментальных данных и анализ полученных результатов. Для

полученной рекомбинантной формы трансаминазы из *A. colombiense* проведена подробная функциональная характеристика. Изучены различные аминокислотные доноры фермента, определены оптимальные условия и кинетические параметры реакций трансаминирования, проанализированы термостабильность фермента, а также взаимодействие трансаминазы с кофактором и ингибиторами. На следующем этапе работы с использованием различных условий кристаллизации фермента проанализированы структуры холофермента трансаминазы из *A. colombiense* и его комплексов с субстратами и ингибиторами. В результате идентифицированы аминокислотные остатки активного центра фермента, участвующие в связывании субстратов. На основе этих структурных данных получен ряд мутантных форм фермента с двойными и одиночными аминокислотными заменами. Анализ биохимических свойств этих форм дополнен разрешением пространственных структур для двух из полученных вариантов. Итогом проведенного анализа результатов является заключение о функциях специфических аминокислотных остатков в активном центре трансаминазы из *A. colombiense*. Выявлены остатки, участвующие в связывании субстратов, стабилизирующие структуру фермента, а также определяющие pH-оптимум катализируемых реакций. Проведенный автором биоинформатический анализ дополнил полученные экспериментальные результаты по исследованию одной из трансаминаз известными из независимых работ структурными детерминантами субстратной специфичности других трансаминаз D-аминокислот. Совместный анализ структурно-функциональных соотношений в этой группе ферментов позволил разделить трансаминазы D-аминокислот на два типа: «канонические» и «неканонические». Трансаминаза D-аминокислот из *A. colombiense* отнесена к группе «неканонических» трансаминаз. В результате проведенной классификации полученные в данной работе результаты можно использовать для изучения и других ферментов данной группы.

Помимо структурно-функциональной характеристики, автор демонстрирует возможности биотехнологического потенциала трансаминазы

из *A. colombiense* в синтезе оптически чистых D-аминокислот различного строения. Для этого разработана и применена трехферментная система, которая включала удаление продуктов реакции трансаминирования и регенерацию кофактора для вспомогательного фермента. Данная система протестирована с различными субстратами в различных условиях. Определены условия максимальной эффективности данной системы в синтезе ряда D-аминокислот: D-гомоаланин, D-норвалин, D-лейцин, D-фенилаланин и D-гомофенилаланин. Исследованы некоторые факторы влияния на выходы целевых продуктов.

Выводы, сделанные в работе, опираются на полученные результаты, соответствуют цели исследования и четко отражают основные положения, выносимые на защиту.

Хотелось бы отметить логичность построения и хорошую структуру текста диссертационной работы. В целом, изложение всех разделов ясное и четкое. Работа практически не содержит опечаток и грамматических/синтаксических ошибок, хотя некоторые выражения, такие как «петля способна отклониться от активного центра», и не совсем удачны. В некоторых случаях хотелось бы видеть больше деталей приводимых в обзоре литературы работ. Например, есть мнение, что направленная эволюция помогает лучше решить проблемы, возникающие при дизайне ферментов. В этой связи хотелось бы более дифференцированной информации в предложениях типа: «Инженерия ферментов включала классическую направленную эволюцию, компьютерный анализ и моделирование комплексов ферментов с субстратами, а также сайт-направленный мутагенез.» Напротив, с точки зрения оппонента, автор излишне детализирует фундаментальную проблему структуры и функции белков, когда пишет о «взаимосвязи последовательность-структура-функция». Поскольку аминокислотная последовательность представляет собой первичную

структуру, общепринятым является упоминание проблемы структуры и функции белков без отдельного выделения уровня первичной структуры.

Следует отметить, что описанные для ПЛФ-зависимых ферментов 7 различных структурных типов сворачивания (фолдов) отличаются не только конформацией ПЛФ или ПЛФ-связывающего домена. Однако в контексте целевого фермента автор в разных местах текста говорит о четвертом типе структурной укладки именно ПЛФ или ПЛФ-связывающего домена. Например, на стр. 6 «IV типа укладки PLP-связывающего домена», на стр. 7 «IV типа PLP-укладки», на стр. 67: «Во всех структурах трансаминаз IV типа PLP-укладки». С другой стороны, и при обсуждении рис. 2 ясно указывается лишь на две конформации ПЛФ. В связи с этим не следует смешивать типы фолдов и типы укладки ПЛФ, как это делается в тексте.

Интересен приводимый в обзоре литературы факт, что ДААТ обнаружены лишь в бактериях и растениях. Есть ли какие-то родственные таким трансаминазам последовательности у животных, у которых Д-аминокислоты играют важную роль в функциях мозга и превращаются оксидазами Д-аминокислот?

Некоторые замечания есть и по изложению экспериментальной части. На рис 15 метчики 25 и 15 кДа (разница 10 кДа) расходятся менее, чем метчики 30 и 25 кДа (разница 5 кДа), свидетельствуя об ошибочной ассоциации белковых полос метчиков с молекулярными массами (обычно есть полосы 25, 20 и 15). Если для структурных исследований удаляли His-таг, то почему функцию фермента характеризовали без удаления? Если His-таг мог влиять на структуру, изучение проблемы соотношения структуры и функции требует соответствия исследуемых препаратов. В таблицах по изучению субстратной специфичности не указано, являются ли использованные фиксированные концентрации ко субстратов насыщающими.

Говоря о комплексах фермента с лигандами, автор различает комплекс фермента с ПЛФ и комплексы с субстратами и ингибиторами. Поскольку

комплексы с субстратами/ингибиторами не подразумевают наличие в них кофермента  $\text{p}10\text{g}$ , а в контексте (например, названия колонок в таблицах, см Таблицу 10) наличие кофермента определено лишь для одного из изученных типов комплексов, возникает вопрос, получены ли комплексы с субстратами и ингибиторами в присутствии ПЛФ. Эта информация существенна, но во многих случаях не очевидна. Было бы желательно уже в ходе изложения определить комплекс фермента с ПЛФ как холофермент (готов к катализу) и отличать его от апофермента (каталитически латентная форма). Именно такими понятиями автор оперирует в заключении, однако своевременные определения в тексте упростили бы понимание результатов при чтении работы.

Аналогично, по тексту часто упоминается утечка ПЛФ (например, на стр. 49: «Скорость «утечки» PLP из активного центра регистрировали по убыли оптической плотности при 430 нм, чтобы минимизировать вклад свободного PLP в поглощение»), тогда как на самом деле механизм утечки – диссоциация образовавшегося в первой полуреакции ПМФ. С учетом ковалентной модификации кофактором ПЛФ лизинового остатка активного центра сложно представить утечку именно ПЛФ. Тем не менее, именно она часто упоминается в тексте, несмотря на четко сформулированный (например, на стр. 62) механизм потери кофактора: ««утечка» кофактора в результате восстановления PLP до PMP и диссоциации PMP-формы фермента.» Тут же (стр 62) говорится о том, что «добавление свободного PLP стабилизирует PLP-форму AmicoTA в условиях реакции». Если есть стабилизация, то почему константа скорости диссоциации комплекса AmicoTA с PLP в Таблице 13 в 1.7 раз выше в присутствии ПЛФ?

В ряде случаев представляется целесообразным более расширенное обсуждение экспериментального дизайна и/или полученных результатов представляется. Например, из интерпретации зависимости термостабильности от концентрации фермента, приводимой на стр. 62, следует, что фермент

сильнее инактивируется при высокой концентрации: «В реакционных условиях в присутствии субстратов (100 мМ D-лейцина и 20 мМ  $\alpha$ -кетоглутарата) период полуинактивации PLP-формы AmicoTA сократился до 10 мин при 60 °С... Эксперименты по определению термостабильности проводили с ферментом в концентрации 1,5 мг/мл (45 мкМ), тогда как в стандартных условиях определения активности (при 60 °С) концентрация фермента значительно ниже (0,001-0,002 мг/мл или 0,03-0,06 мкМ), поэтому в стандартных условиях инактивации фермента не наблюдается в течение часа.» Из текста нет ясности, отличаются ли «реакционные условия» (первое предложение) от стандартных условий определения активности (последнее предложение) и какие конкретно факторы влияют на полученные в разных условиях параметры термоинактивации. Желательно узнать мнение авторов о причине указанной ими в вышеприведенной цитате повышенной температурной денатурации при высокой, а не низкой, концентрации белка, поскольку обычно белки более стабильны в высоких, чем в низких, концентрациях. На стр. 67 отмечается, «что консервативный для DAAT остаток E172 координирует N1 атом напрямую в одной субъединице и через молекулу воды в другой субъединице (Рисунок 24 Б).» Однако никак не комментируются возможные последствия такой разницы для катализа. Из текста на стр. 78 мы узнаем, что мутация ведет «к снижению оптимальной температуры реакции трансаминирования с 60 °С до 40 °С.» Однако во введении и обзоре литературы не было акцента на трансаминазах из мезо/термофильных организмов. *A. colombiense* принадлежит к мезофилам, для которых T оптимум от 20 до 45 С. Чем можно объяснить температурный оптимум фермента 60 °С? Может ли неканонический активный центр быть связан с мезо/термофильностью? Хотелось бы видеть более четкое обсуждение аномального смещения рН оптимума трансаминирования для мутанта K237A, как в контексте собственных представлений о механизме катализа, так и при сравнении с данными литературы.

Описанные в разделе 3.6 возможности применения изученного фермента в биотехнологических процессах синтеза оптически чистых изомеров Д-аминокислот требуют более тщательного обсуждения, в том числе с точки зрения обоснования предложенной трехферментной системы с использованием НАДН, ее экономически выгодных альтернатив и использования полученных вариантов фермента.

Высказанные замечания по отдельным аспектам не затрагивают существа работы, поскольку выносимые на защиту положения расширяют наши знания о структурно-функциональных соотношениях ферментов и подтверждены совокупностью проведенных экспериментов.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.4 – Биохимия (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шилова Софья Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник отдела биокинетики  
Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени



А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.



Буник-Фаренвальд Виктория-Лариса Ивановна

08.01.2024

Контактные данные: 119992, Москва, ул. Ленинские Горы, д.1, стр. 40. Тел.: +7-495-939-4484, e-mail: [bunik@belozersky.msu.ru](mailto:bunik@belozersky.msu.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.04 Биохимия

Адрес места работы: 119992, Москва, ул. Ленинские Горы, д.1, стр. 40. МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского.

Тел.: +7-495-939-4484, e-mail: [bunik@belozersky.msu.ru](mailto:bunik@belozersky.msu.ru)