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 интересной и весьма актуальной теме исследования особенностей структурной организации и функциональности трансаминазы D-аминокислот. Несмотря на то, что природные белки как правило включают только L-аминокислоты, но востребованность D-аминокислот живыми системами очень высока. Они входят в состав большого количества биологически активных пептидов, которые все более широко применяются в медицине, сельском хозяйстве, пищевой индустрии и т.п. Получение чистых стереоизомеров аминокислот чрезвычайно актуально для химического синтеза таких пептидов, что требует разработки методов получения изомеров аминокислот в промышленном масштабе. Наиболее современные схемы получения оптически чистых органических соединений подразумевают использование природных или модифицированных ферментов, которые позволяют эффективно и экологично нарабатывать необходимые продукты.

Работа Софьи Александровны касается как фундаментальных аспектов функционирования одного из типов промышленно значимых ферментов – пиродоксаль-5’-фосфат зависимых трансаминаз IV типа, используемых для (R)-стереоселективного аминирования органических соединений и синтеза оптически чистых аминокислот, так и разработки схемы использования ферментов этого типа для синтеза D-аминокислот. Таким образом, **актуальность** её диссертационной работы несомненно очень высока и с фундаментальной точки зрения, в плане определения особенностей стереоспецифического функционала ферментов, и с разработки практического

подхода к ферментативному синтезу D-аминокислот в промышленном масштабе.

В ходе целенаправленного поиска Софьей Александровной была идентифицирована новая трансаминаза бактерии *Aminobacterium colombiense*, именованная авторами как AmicoTA. Проведенная структурно-функциональная характеристика новой трансаминазы позволила отнести ее к трансаминазам D-аминокислот с неканонической организацией активного центра. Для этого структура AmicoTA и её комплексов с субстратом D-глутаматом и ингибитором D-циклосерином была определена с помощью рентгеноструктурного анализа. Кроме того, проведена большая работа по характеризации термостабильности AmicoTA, определению оптимума условий работы фермента по температуре и значению pH среды, специфичности к субстратам и обратимым ингибиторам, влиянию ряда точечных замен на функционирование трансаминазы. Дополнительно впервые исследована возможность применения AmicoTA в трехкомпонентной системе (*R*)-селективного аминирования α-кетокислот, которая может послужить основой разработки метода биотехнологического применения AmicoTA. Все исследования проведены диссертантом впервые, указанные ключевые результаты составляют **научную новизну работы**.

Диссертационная работа Шиловой Софьи Александровны составлена по классической схеме из трех частей: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение.

Обзор литературы включает сведения о трансаминазах, как о пиридоксаль-5’-фосфат зависимых ферментах, и о биотехнологическом применении ферментов в целом. В первой части подробно рассматривается структурная организация трансаминаз и стадии катализируемых ими реакций. Дан анализ структур известных на данный момент трансаминаз D-аминокислот (DAAT), их субстратной специфичности, поставлен вопрос о недостаточности сведений о взаимосвязи структуры и функции DAAT. Вторая часть обзора касается применения ферментов в биотехнологии и, в частности,

для стереоспецифического синтеза. Рассмотрены варианты повышения специфичности и термостабильности ферментов с помощью целенаправленных замен аминокислотных остатков в ферментах. Из проведенного анализа литературных источников логично вытекает **цель представленного исследования**: определение структурных основ субстратной специфичности трансаминаз D-аминокислот на примере DAAT из *Aminobacterium colombiense* посредством получения оригинальных структурно-функциональных данных и в сравнении с аналогичными данными, существующим для гомологичных DAAT.

В части «Материалы и методы исследования» дано исчерпывающее описание используемых в работе подходов, которое позволит независимо повторить исследования автора. Важной главой является описание методик определения активности трансаминаз, поскольку рабочий цикл этих ферментов представляет целую совокупность цепочки реакций, и вычленение именно исследуемых в работе стадий позволяет оценить значимость полученных кинетических характеристик фермента.

«Результаты и обсуждения» представлены в полной мере. Все полученные автором данные исчерпывающе представлены в табличной форме и в виде графиков, показана статистическая значимость результатов, дан подробный анализ зависимостей. Приведены иллюстрации обсуждаемых структур холофермента, комплексов AmicoTA с субстратами/ингибиторами, а также двух мутантных форм фермента. Комбинация полученных структурных и функциональных данных позволило в полной мере установить характеристики фермента и заключить, что неканоническая организация активного центра AmicoTA определяет высокую стереоселективность трансаминирования ферментом, причем наибольшую активность синтеза AmicoTA проявляет по отношению к D-гомоаланину, D-норвалину, D-лейцину, D-фенилаланину и D-гомофенилаланину из кетокислот. Наиболее существенную роль в определении специфичности к субстратам играют аминокислотные остатки R27, T34, H175 и K237 AmicoTA. Выводы работы

опираются на совокупность полученных Софьей Александровной экспериментальных результатов и их критического анализа в сопоставлении с имеющимися литературными данными.

По диссертации имеются следующие **замечания и пожелания**.

1. Подпись к рисунку 15 с хроматограммами очистки AmicoTA неполная. Так, на рисунке 15а с гель-фильтрацией отсутствует калибровочная кривая, из которой можно было бы подтвердить димеризацию фермента. На рисунке 15б нет шкалы проводимости, хотя на правой вертикальной оси имеется соответствующая подпись; нет объяснения наличия двух пиков на хроматограмме и не приводится обоснованность измерения оптической плотности при 410 нм. В последнем случае в качестве пояснения можно было бы дать ссылку на главу 3.2.4. со спектром PLP-формы AmicoTA.
2. На стр. 71 приводится фраза «Учитывая ограниченную подвижность кристаллов холофермента…», которую корректнее было бы сформулировать как «Учитывая ограниченную подвижность молекул холофермента в кристалле…».
3. Пожелание относительно таблицы 17 на стр. 87. Выравнивание аминокислотных последовательностей лучше отображать моноширинным шрифтом типа Courier, тогда соотнесение положений остатков при сравнении получается более наглядным.
4. В работе объект исследования называется AmicoTA, хотя большинство гомологов именуются в литературе как DAAT с префиксом из сокращенного наименования исходной бактерии. Возможно, в дальнейшем стоит придерживаться такой номенклатуры названия для исследуемого фермента.

Указанные замечания имеют редакторский характер, не относятся к научному содержанию работы и не умаляют значимости данного диссертационного исследования. 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, а также 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, заместитель директора по науке Института белка РАН, главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции.

Никулин Алексей Донатович 20.12.2023

Контактные данные: 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 4, к. 410. Тел.: 8 4967 318425 e-mail: nikulin@vega.protres.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.10 – Биоорганическая химия, 03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы: 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 4. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук

Тел.: 8 4967 318425 e-mail: nikulin@vega.protres.ru