

ОТЗЫВ

**официального оппонента Сольева Павла Николаевича
на диссертационную работу Шиловой Софьи Александровны
на тему: «Особенности организации активного центра неканонической
трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense*»,
представленной на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия»**

Актуальность диссертационного исследования

Ферментативный катализ занимает значимое место не только в фундаментальной биохимии и энзимологии, но также и в их прикладных аспектах, как удобный инструмент получения оптически чистых органических соединений, для применения в полном синтезе фармакологически значимых субстанций, и даже в терапии онкозаболеваний. Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые ферменты получают всё большее распространение в решении перечисленных задач, в том числе благодаря разнообразию их мутантных форм, источников, и возможных катализируемых реакций и продуктов.

В последнее десятилетие многие прикладные процессы биохимии и биотехнологии переориентировались на ферментативный катализ с традиционных микробиологических синтезов, для которых ранее была необходима генноинженерная модификация всего микроорганизма с целью получения оптимального продуцента. Микробиологический способ ограничивает конверсию процесса из-за необходимости сохранения жизненно важных метаболических путей самого продуцента, и кроме того, накладывает необходимость разработки порой нетривиальных способов извлечения и очистки продукта из микроорганизма. Реакции с участием непосредственно фермента обычно лишены этих недостатков, что позволяет сконцентрироваться на оптимизации их работы под заданный субстрат, и, благодаря точечным заменам аминокислот, добиться специфичности или стабильности в тех или иных условиях.

Новизна исследования и достоверность результатов

Работа Шиловой Софьи Александровны посвящена изучению новых представителей трансаминаз D-аминокислот, входящих в общий класс трансаминаз IV типа и катализирующих стереоселективный перенос аминогруппы с D-аминокислоты на α -кетокислоту с образованием новых D-аминокислоты и α -кетокислоты.

Основной упор в работе Софьи Александровны сделан на характеризацию активных центров новых ферментов на примере рекомбинантной трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* (AmicoTA) и создание мутантных форм (и холоформы) этого фермента как способ изменения субстратной специфичности и стабильности для нужд биотехнологии. В своей работе диссертант поставила целью не только получение различных вариантов AmicoTA и её анализ, но и детальное изучение её мутантных форм с аминокислотными заменами в активном центре для выявления взаимосвязи «структура – активность». Выбор нового микроорганизма и неканоничность самого фермента, имеющего отличную от известных укладку аминокислотных остатков в активном центре, обуславливает новизну диссертационной работы. Достоверность результатов подтверждается проведением экспериментов в трех и более повторах и обработкой данных с использованием современных статистических методов.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационное исследование Шиловой С.А. создаёт задел для дальнейшего изучения рекомбинантных мутантных форм трансаминаз и показывает системный подход её работы.

Перед автором стояла классическая и всегда актуальная задача изучения нового фермента известного класса из нового бактериального источника, его тщательная характеристика кристаллографическими данными, получение мутантных форм и определение влияния измененной структуры на проявляемую активность. Одновременно с этим, диссертант детально рассмотрел спектральные характеристики и соотнёс наблюдаемое течение

ферментативных превращений с известными параметрами промежуточных переходных состояний пиридоксаль-5'-фосфат-зависимого катализа. Шиловой С.А. исследована субстратная специфичность для потенциального биотехнологического применения фермента в синтезе оптически чистых D-аминокислот. Интересно, что всего одна аминокислотная замена K237A в активном центре мутантной формы раскрыла активность трансаминазы в кислых средах, что является ценной характеристикой для данного семейства. По результатам исследований диссертантом депонированы в банк данных белковых структур (Protein Data Bank) семь новых структур (PDB коды 8AHR, 8ONJ, 8ONL, 8AYK, 8AIE, 8AYJ, 8ONN).

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Шиловой Софьи Александровны изложена на 113 страницах, построена традиционно и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, приложение и список цитируемой литературы. Список цитируемой литературы состоит из 199 источников. Содержание диссертации полностью соответствует специальности 1.5.4 – «Биохимия».

Во введении четко обоснована цель и актуальность исследования, обозначена ожидаемая практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы интересно освещена история изучения пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов в России и зарубежом, приведены необходимые данные по строению трансаминаз, схеме их работы, а также механизм содействия кофактора, пиридоксаль-5'-фосфата, в реакции трансаминирования. Примечательно, что диссертант глубоко погрузилась в исторический контекст и отметила не последнюю роль именно советских учёных и, особенно, группы проф. А.Е. Браунштейна. Кроме этих фактов, в обзоре диссертант привела необходимые для понимания сути работы механизмы классических реакций трансаминирования ферментов IV типа,

суммировала данные по молекулярной биологии (конструктам, функциям отдельных аминокислотных остатков в карманах фермента, и типам связывания). На примере уже известных трансаминаз D-аминокислот приведены кинетические параметры и свойства описанных в научной литературе ферментов, наглядно показана взаимосвязь сродства субстрата к ферменту от природы субстрата. Наконец, в главе, посвященной прикладному биокатализу и применению трансаминаз, приводится перечисление методов синтеза фармацевтических препаратов с некоторыми ключевыми стадиями на основе действия трансаминаз. Автор привела прогностический потенциал внедрения биокатализа на основе реакции трансаминирования в отношении новых лекарств, подробно рассмотрев возможности оптимизации синтеза и достоинства и недостатки такого асимметрического трансаминирования кетосоединений. Таким образом, освещенный в литературном обзоре материал послужил необходимым и достаточным введением в современное состояние исследований по теме диссертационной работы и раскрыл потенциальную применимость объекта исследования в синтезе фармакологически значимых субстанций.

В экспериментальной части работы приведены использованные материалы, методы молекулярной биологии и генной инженерии, протоколы выделения, валидации и очистки, методы кристаллизации, а также спектральные данные. Отдельной главой приводится анализ кинетических параметров и термостабильности ферментов. В этом же разделе глава посвящена описанию полученных данных рентгеноструктурного анализа выделенных ферментов.

Обсуждение результатов раскрывает подробно наблюдения и закономерности, полученные в ходе проведения экспериментов, и следует заявленным целям работы. Изучение взаимодействия AmicoTA с аналогами субстратов – обратимыми ингибиторами – показало разницу в механизме взаимодействия 3-аминооксипропионовой кислоты и D-циклосерина. Совместно с коллегами диссертантом была определена пространственная

структура AmicoTA с разрешением 1,9Å, подробно описано строение фермента; для установления механизма узнавания субстратов были получены структуры комплексов фермента с субстратом и ингибиторами, идентифицированы два сайта связывания субстратов в О- и Р-карманах, а также впервые экспериментально подтверждена теоретически возможная структура аддукта PLP с разомкнутой формой D-цикloserина.

Следующим шагом работы Шиловой С.А. стал анализ шести мутантных форм фермента, отличающихся заменами в активном центре функциональных групп, способных к электростатическим взаимодействиям и водородным связям. Определена роль замен, кинетические параметры и стабильность, и показана возможность подбора рабочего диапазона активности мутантных ферментов в разных средах, в рН среды от 5,2 до 10. На основании полученных данных в различных условиях автор делает вывод о вкладе остатков активного центра в узнавание и дифференциацию субстратов.

Завершив все фундаментальные аспекты описания фермента и его вариантов, автор перешла к оценке потенциала AmicoTA в синтезе оптически чистых D-аминокислот с участием AmicoTA, (R)-гидроксиглутаратдегидрогеназы из *Acidaminococcus fermentans* и глюкозодегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. В результате апробации предложенной диссертантом трехферментной системы, показано достижение количественных выходов и энантиоселективности для синтезов D-гомоаланина, D-норвалина, D-лейцина и D-гомофенилаланина.

В своей диссертационной работе Шиловой С.А. удалось суммировать все базовые характеристики фермента и его 6 мутантных форм и оценить их прикладное значение для синтеза некоторых D-аналогов аминокислот. Результаты работы доложены на 6 российских и международных конференциях и опубликованы в виде 4 статей в российских и международных журналах, индексируемых в базах Web of science и Scopus. Можно отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации, хорошо структурированной и написанной понятным

научным языком. Аналогично, за исключением незначительных опечаток, хорошо изложен материал и в автореферате.

Тем не менее, к работе есть ряд комментариев и замечаний, требующих уточнения, но не влияющих на общую положительную оценку работы и носящие рекомендательный характер.

Замечания

1) По ходу обзора литературы наблюдается несформированный порядок упоминания полных и сокращенных видовых названий микроорганизмов, что заметно для *Escherichia Coli*, *Necteria haematococca*, в то же время *C. pusillum* сокращена преждевременно ещё до первого своего упоминания в тексте (с. 19-20 и далее).

2) В экспериментальной части описано, что для определения концентрации белков применялся рассчитанный коэффициент экстинкции, который может отличаться от экспериментального. Можно было определить концентрацию белка методом Брэдфорд или Лоури, соотнести с поглощением и найти экспериментальный коэффициент экстинкции (с. 41).

3) При выделении и очистке рекомбинантных форм трансаминазы после элюции инкубировали с 1 мМ раствором PLP. Связан ли этот этап с потерей белком PLP в ходе очистки, и как это проверяли? В то же время, при подготовке для кристаллизации AmicoTA WT в буфере 8 не указан PLP. В тексте работы не найдено, как проверяли активность трансаминаз в ходе очистки.

4) Терминология и детали отдельных важных 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». При анализе функциональных свойств фермента пункт 2.5.5. посвящен «утечке» PLP из и встраиванию PLP в активный центр. Вероятно, автор подразумевает диссоциацию кофактора в активном центре? В каком буфере снимали спектры поглощения, и регистрировали ли изменение спектров во времени? Для

обсуждения результатов следовало бы определить константу диссоциации PLP и оперировать этими данными (с. 58).

5) В экспериментальной части текста диссертационной работы не прослеживается информация, был ли исследован холофермент, как его получали, и каков процент связанного PLP в его активном центре (с. 49 и с.60). Аналогичная неясность в пункте 3.2.6. по «утечке» PLP из активного центра AmisoTA – определяли ли содержание PLP и активность фермента до и после хранения? В течение какого периода времени сохраняется стабильность фермента?

6) С чем связано, что на Рис. 15 на электрофореграмме молекулярный вес субъединицы без His-фрагмента замечен менее 30 кДа, в то время как в тексте приведена её молярная масса 33,2 кДа (с. 56)?

7) Ссылка 31 на литературу (с. 12) ведет не к первоисточнику описанной трехмерной структуры трансаминазы, а к более поздней статье в *Nature*, где была приведена эта структура в более высоком разрешении, однако уже за авторством исключительно кристаллографов, занимавшихся интерпретацией РСА, и без группы проф. А.Е. Браунштейна.

8) В тексте диссертационной работы содержится незначительное количество опечаток (преимущественно, с. 28-36).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости данного диссертационного исследования. В целом, диссертационное исследование Шиловой С.А. выполнено грамотно, изложено последовательно и целостно, указанные результаты являются оригинальными и отражают как новизну данной работы, так и проявленное диссертантом высокое экспериментальное мастерство.

Диссертационная работа 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, определенными 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.

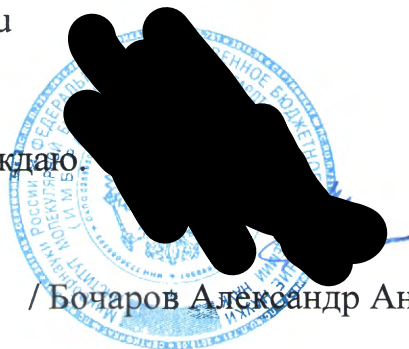
Официальный оппонент,
ведущий научный сотрудник,
руководитель лаборатории химических основ биокатализа
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН)
кандидат химических наук,



/ Сольев Павел Николаевич

Специальность: 03.01.03 – Молекулярная биология
Почтовый адрес: 119991, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.
Телефон: +7 (499) 135-9858
Факс: +7 (499) 135-1405
Адрес электронной почты: solyev@eimb.ru

Данные и подпись Сольева П. Н. подтверждаю.
Ученый секретарь ИМБ РАН, к.в.н.



/ Бочаров Александр Анатольевич

«27» декабря 2023 г.