

О Т З Ы В

на автореферат диссертации Степашкиной Анастасии Владимировны
"Бактериальная пенициллинацилаза: взаимосвязь структура – функция и получение
одноцепочечной формы фермента", представленной на соискание ученой степени кандидата
химических наук по специальностям 03.01.04 – Биохимия и
03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Пенициллинацилаза (КФ 3.5.1.11) относится к семейству Ntn-гидролаз и катализирует реакцию гидролиза амидной связи в антибиотиках пенициллинового ряда. Этот фермент широко используется для получения полусинтетических β -лактамных антибиотиков, а также для разделения смеси рацематов и получения оптически чистых аминокислот и их аналогов, аминокспиртов и т.п. Практическое применение находят иммобилизованные ферменты дикого типа, и их мутантные формы, созданные для осуществления заданного превращения, что позволяет с высоким выходом синтезировать антибиотики или получать стереоизомеры высокой оптической чистоты. Соответственно, актуальность, новизна и практическая значимость диссертационной работы А.В.Степашкиной представляется вполне очевидной.

Объектом исследования диссертационной работы А.В.Степашкиной является пенициллинацилаза из грамотрицательной бактерии *Alcaligenes faecalis*. Этот фермент обладает по сравнению с ферментом из *E.coli* повышенной термостабильностью и смещенным в щелочную область более широким рН-оптимум активности. В первой части работы А.В.Степашкиной было исследовано влияние случайных мутаций на уровень экспрессии, каталитические свойства и температурную стабильность мутантных форм, полученных при клонировании пенициллинацилазы *A.faecalis*, и проведено их сравнение с рекомбинантной *A.faecalis* дикого типа. Автор осуществил экспрессию шести клонов, полученных при клонировании гена пенициллинацилазы *A.faecalis* и фермента дикого типа. Было установлено, что уровень экспрессии и кинетические параметры заметно отличаются для разных мутантных форм пенициллинацилаз, а появление заряженных остатков внутри белковой глобулы и увеличение гидрофобности поверхности белка приводят к дестабилизации фермента и снижению его термостабильности. Во второй части работы, на основании анализа структуры *rac*-гена, кодирующего пенициллинацилазу, особенностей экспрессии гена и процессов «созревания» фермента, А.В.Степашкиной было высказано предположение о целесообразности создания новой генно-инженерной конструкции, кодирующей одноцепочечную пенициллинацилазу, которая не подвергается процессингу, что позволяет сразу получать активный фермент в цитоплазме *E.coli*. Анализ трехмерной структуры пенициллинацилазы *A.faecalis* дикого типа показал, что N-конец α -субъединицы и C-конец β -субъединицы пространственно сближены и образуют β -лист, что открывает возможность для соединения N- и C-концов коротким пептидом. Компьютерное

моделирование привело к двум вариантам линкера, отличающихся по аминокислотному составу, длине и жесткости полипептидной цепи. Совокупность этих структурных особенностей должны были, по мнению автора, исключить конформационные напряжения в области N- и C-концов субъединиц. Анализ экспрессии одноцепочечной пенициллинацилазы показал, что фермент накапливается в нерастворимой форме. Поэтому на следующих этапах работы А.В.Степашкиной были детально исследованы экспрессия двух одноцепочечных форм пенициллинацилазы и рефолдинг этих ферментов. Были найдены оптимальные условия как для экспрессии (4 ч, 30°C), так и для рефолдинга (степень разбавления раствора белка, концентрация мочевины и продолжительность процесса). Изучение каталитических параметров одноцепочечных пенициллинацилазы *A.faecalis* показало, что они даже несколько лучше, чем у фермента дикого типа, однако температурная стабильность в 1.2-1.4 раза хуже.

Выполнение диссертационного исследования потребовало от А.В.Степашкиной творческого владения современными методами молекулярной биологии, биофизики и биохимии. Автор продемонстрировал способность самостоятельно планировать и проводить эксперименты. Существенным представляется, и умение А.В.Степашкиной критически оценивать полученные результаты.

Таким образом, диссертационная работа А.В.Степашкиной по актуальности поставленных задач, научной и практической значимости полученных результатов, обоснованности выводов, а также методическому уровню, в полной мере соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а А.В.Степашкина несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – Биохимия и 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории молекулярных основ действия
физиологически-активных соединений
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт молекулярной
биологии им. П.А.Орешникова Российской
академии наук

доктор химических наук

02 декабря 2017 г.



А.Р.Хомутов

Подпись А.Р. Хомутова удостоверяю
уполномоченный секретарь ИМБ РАН