

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Степашкиной Анастасии Владимировны «Бактериальная пенициллинацилаза: взаимосвязь структура – функция и получение одноцепочечной формы фермента», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Пенициллинацилаза широко используется на практике для гидролиза природного пенициллина G и для получения полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. Широкое распространение антибиотикорезистентности к известным бета-лактамам требует разработки новых антибиотиков, которые часто содержат неприродные функциональные группировки и в этом случае высокая специфичность ферментов к природным молекулам становится их большим недостатком по отношению к неприродным соединениям. Получение новых форм ферментов с заданными свойствами невозможно без детального проведения фундаментальных исследований по изучению взаимосвязи структура-функция интересующего фермента. Такие работы создают основу для целенаправленного изменения свойств биокатализаторов с помощью методов белковой инженерии. Кроме того, данные фундаментальных исследований позволяют создавать новые конструкции и повышать эффективность биосинтеза рекомбинантных ферментов.

Учитывая вышесказанное, в отношении объекта исследования диссертационной работы Степашкиной А.В. – фермента класса гидролаз пенициллинацилазы (ПА, КФ 3.5.1.11) – следует подчеркнуть, что ПА дикого типа характеризуется сложным многостадийным процессингом, который ограничивает продуктивность штаммов-продуцентов рекомбинантной ПА и возможность получения новых активных мутантных форм с высоким уровнем экспрессии. Задача разработки новых генно-инженерных конструкций, позволяющих упростить процедуру получения ПА за счет снижения длительности культивирования очень актуальна как для практики, так и для фундаментальных исследований.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. посвящена характеристике пенициллинацилазы (ПА) из бактерии *Alcaligenes faecalis*, штамм VKM B-1518 (DSM). Работа представляет интерес для фундаментальной науки и несомненно обладает теоретической значимостью, поскольку исследует структурно-функциональную взаимосвязь на примере мутантных форм со случайными аминокислотными заменами, а также влияние структуры гена фермента на свойства и функциональность одноцепочечной формы фермента, опосредованную иным порядком сворачивания

белка. С другой стороны, диссертационная работа имеет немалое практическое значение, в связи с возможностью упрощения и стандартизации условий экспрессии генов мутантных форм фермента.

Диссертационная работа Степашконой А.В. состоит из двух взаимосвязанных частей. В первой части работы диссертантом было изучено влияние случайных мутаций в гене ПА на экспрессию, каталитические свойства и температурную стабильность. Полученные данные показали, что изученные случайные аминокислотные замены могут оказывать существенное влияние на уровень биосинтеза рекомбинантного белка. Поэтому во второй части работы была поставлена и успешно решена задача получения одноцепочечной формы ПА. В результате при получении активного фермента была исключена посттрансляционная модификация, необходимая для получения активного гетеродимерного фермента из одноцепочечного пробелка. Таким образом, вторая часть работы посвящена получению и сравнительной характеристике одноцепочечной формы ПА.

В диссертационной работе Степашкиной А.В. проведена экспрессия шести мутантных форм и выборочная характеристика их свойств. Полученные структурно-функциональные закономерности и связь аминокислотных замен с эффективностью биосинтеза и свойствами рекомбинантных ферментов обоснованы теоретически с точки зрения фундаментальной науки. В работе обсуждается влияние характера аминокислотных замен на каталитические свойства и термостабильность мутантов. Кроме того, в рамках первой части работы представлена подробная характеристика ПА дикого типа, в том числе определение кинетических параметров, константы Михаэлиса и каталитической константы, а также выполнено всестороннее исследование температурной стабильности двумя методами - изучение кинетики термоинактивации при различных условиях (тип, концентрация и рН буферного раствора, температура инактивации). Было установлено, что зависимость константы скорости инактивации от рН буферного раствора описывается сигмоидальной функцией с точкой перегиба в районе рН 8,5, что соответствует возможной ионизации остатка лизина Lys. Из зависимости константы скорости инактивации от температуры были рассчитаны энтальпия и энтропия активации. Температурная стабильность ПА дикого типа была дополнительно исследована методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). По результатам ДСК следует, что фермент денатурирует необратимо, содержит один калориметрический домен, а теплота

плавления не зависит от концентрации фермента, что подтверждает истинно мономолекулярный характер термоденатурации ПА.

Значительная часть диссертации описывает получение двух вариантов одноцепочечной формы ПА, в том числе компьютерное моделирование структуры и сшивок, получение генно-инженерных конструкций, оптимизацию культивирования штамма-продуцента *E.coli* и детальную характеристику свойств двух вариантов одноцепочечной ПА.

Компьютерный анализ трехмерной модельной структуры ПА показал, что получение одноцепочечной формы фермента теоретически осуществимо и обеспечивается соединением сближенных N- и C- концов α - и β -субъединицы соответственно линкером из нескольких аминокислотных остатков, соединяющим два β -тяжа субъединиц с образованием β -поворота. В результате моделирования был выбран линкер, состоящий из двух блоков GGGS. Два варианта одноцепочечной ПА отличались отсутствием во второй форме остатка пролина β Pro551. Генно-инженерные конструкции двух вариантов были получены методом полимеразной цепной реакции. Выбор системы экспрессии на основе pET24a(+)/*E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS был обусловлен необходимостью обеспечить высокий уровень экспрессии с помощью сильного T7 промотора и исключить протеолитическую активность внутриклеточных протеаз в связи с цитоплазматической локализацией одноцепочечной ПА.

В результате оптимизации условий культивирования было показано, что наибольший вклад в итоговый выход активной и растворимой одноцепочечной ПА вносит температура культивирования. Анализ проб, отобранных в процессе культивирования, на растворимую и нерастворимую фракцию белка методом аналитического SDS-ПААГ электрофореза показало, что при температуре культивирования 20°C достигается максимальный выход активной одноцепочечной ПА в растворимой форме (около 1000 Ед. с литра среды), в то время как культивирование при повышенных температурах (30°C) приводит к преимущественному накоплению белка в виде нерастворимых телец включения, составляющих значительную долю общего белка клетки. Автором был проведен рефолдинг одноцепочечной ПА из нерастворимых агрегатов методом солиubilизации клеточного осадка в 8 М мочеvine с последующей инкубация в растворах мочеvine различной концентрации. Проведенные эксперименты показали, что рефолдинг возможен, и часть пенициллинацилазной активности действительно

восстанавливается. Следует подчеркнуть, что содержание одноцепочечной ПА в клеточном осадке велико, а сам целевой белок содержит низкий процент примесных белков по сравнению с растворимой фракцией.

По научному содержанию работы практически нет замечаний. Работа написана понятным научным языком. Экспериментальная часть работы характеризуется значительным объемом и выполнена корректно на высоком научном и профессиональном уровне с использованием большого количества современных физико-химических методов исследования белков. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений. Диссертационная работа обладает внутренним единством, и все ее части взаимосвязаны. Обзор литературы соответствует тематике диссертации, написан подробно и охватывает научные публикации большого временного интервала, начиная с открытия ПА и заканчивая последними современными исследованиями фермента, а также содержит общие разделы по экспрессии и фолдингу рекомбинантных белков, по пермутированным белкам и одноцепочечным псевдодимерам, что очень важно для понимания особенностей получения одноцепочечной формы ПА. Все выводы аргументированы и согласуются с результатами работы.

К оформлению работы можно сделать несколько замечаний.

1. В разделе 2.4, стр. 17 непонятна фраза «Позже в работе [53] была определена нуклеотидная последовательность гена, кодирующего ПА из бактерий *E.coli* ATCC 11105 и установлено соответствие четырех структурных доменов открытой рамки считывания гена ПА». Соответствие чему?

2. Включение в литературный обзор химических формул, описывающих превращение пенициллина при обработке ПА и другими ферментами, а также схемы каталитического центра ПА могло бы существенно облегчить понимание весьма подробного их описания в тексте.

3. В пункте 4.2.5.1 раздела «Результаты и их обсуждение» (Оптимизация культивирования рекомбинантного штамма *E.coli*, с. 114) непонятно обозначены условия «0 мМ/2 мМ CaCl₂», что более корректно выглядело бы как «в отсутствие хлорида кальция и при концентрации 2 мМ».

4. Еще одно пожелание касается обсуждения кинетических параметров, на с. 134 («Результаты и их обсуждение», п. 4.2.8.1). В таблице 4.12 приводятся экспериментально полученные значения каталитической константы, но их сравнение с данными из обзора литературы отсутствует, что несколько затрудняет интерпретацию

данных. Указанные замечания и пожелания носят общий характер и не влияют на основные результаты и выводы диссертации.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. построена по классической схеме и состоит из шести основных глав: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Диссертация изложена на 164 страницах, содержит 41 рисунок, 19 таблиц и 192 ссылки. Результаты диссертационной работы представлены в 14 публикациях, в том числе три - в научных журналах из перечня ВАК РФ. Автореферат соответствует основному содержанию работы.

В заключение следует отметить, что диссертационная работа Степашкиной А.В. представляет оригинальное законченное научно-квалификационное исследование, которое полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции от 21 апреля 2016 г. № 335), а ее автор безусловно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Руководитель лаборатории клеточной биологии рецепторов ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, доктор химических наук



А.Г. Петренко

Подпись д.х.н. А.Г. Петренко заверяю

Ученый секретарь ИБХ РАН,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.
Тел. +7 (495) 335-41-77
Электронный адрес официального оппонента: petrenkoag@gmail.com.

30 ноября 2017 года