

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 (ПА) относится к классу гидролаз, подклассу амидогидролаз и катализирует расщепление амидной связи в пенициллине. Фермент имеет важное значение в биотехнологиях получения полусинтетических β -лактамных антибиотиков. Несмотря на лучшую изученность и широкое применение на практике фермента ПА из бактерий *E.coli*, ПА из бактерий *Alcaligenes faecalis* обладает значительными преимуществами, которые выгодно отличают этот фермент и делают его достойной альтернативой существующим запатентованным коммерческим препаратам ПА. Получение биокатализаторов с улучшенными свойствами методом рационального дизайна, а также направленный мутагенез функционально важных аминокислотных остатков являются важнейшим направлением создания эффективных биокатализаторов. Также для создания эффективных биокатализаторов имеют большое значение и другие стадии, включая оптимизацию условий культивирования штаммов, способ наработки фермента в клетке (тельца включения), выделение фермента, его очистка и условия рефолдинга. Все эти подходы сохраняют свою актуальность при создании промышленных биокатализаторов.

Актуальность темы диссертации

Основной целью диссертационной работы Степашкиной А.В. являлось изучение структурно-функциональной взаимосвязи в ПА на примере нескольких мутантных форм фермента и получение одноцепочечной формы ПА с помощью белковой инженерии. Экспрессия фермента в виде одноцепочечной формы исключает сложный и многостадийный процесс посттрансляционной модификации, включающий транспорт пропептида в периплазму и выщепление пептида, приводящее к образованию активного гетеродимера. Создание одноцепочечной формы фермента позволило значительно упростить и стандартизировать условия получения мутантов ПА на этапе культивирования. Получение одноцепочечного фермента обеспечило сокращение длительности культивирования по сравнению с процессом получения ПА дикого типа, что, в свою очередь, приводит в итоге к снижению себестоимости биокатализатора. С учетом этого поставленные задачи диссертации являются актуальными как на уровне научных задач, решаемых в лаборатории, так и с точки зрения экономической выгоды в масштабах промышленного процесса. Кроме того, получение одноцепочечной ПА представляет

большой интерес с фундаментальной точки зрения для выявления структурных основ сборки белковой глобулы и проявления каталитической активности.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. обладает несомненной научной новизной. До проведения данного исследования известна из литературы лишь одна неудачная попытка (выход микрограммы с литра среды, более низкая удельная активность по сравнению с ферментом дикого типа) получения пермутированной одноцепочечной ПА из *E.coli*. В данной диссертационной работе впервые получены два варианта одноцепочечной формы ПА из *Alcaligenes faecalis* с выходом более 15 мг с литра среды. Эти варианты были получены в высокоочищенном (не менее 95%) виде с помощью рефолдинг фермента из нерастворимого клеточного осадка. Были впервые изучены каталитические свойства и термостабильность обоих вариантов одноцепочечной формы ПА из *Alcaligenes faecalis*.

Полученные в диссертации результаты характеризуются высокой степенью достоверности и надежности, благодаря проведению экспериментов в нескольких повторях, грамотной обработке и интерпретации экспериментальных данных, воспроизводимости и использованию современных физико-химических методов исследования белков. Работа имеет важное теоретическое и практическое значение, поскольку новая генно-инженерная конструкция одноцепочечной формы ПА может быть использована как основа для получения мутантов с улучшенными свойствами, а сам фермент – в промышленности для получения полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов.

Содержание диссертации.

Диссертационная работа имеет внушительный объем (164 страницы) и включает следующие разделы «Введение» (с. 7-9), «Обзор литературы» (с. 10-71), «Материалы и методы исследования» (с. 72-85), «Результаты и их обсуждение» (с. 86-141), а также «Выводы» (с. 142-143) и «Список цитируемой литературы» (192 ссылки, с. 144-164).

Во «Введении» кратко описывается современное состояние исследований по теме диссертации, обосновывается актуальность выбранной темы и основных научных идей и дается общая характеристика содержания работы. Обзор литературы включает систематизацию и анализ большого числа опубликованных экспериментальных работ и обзорных статей по следующим темам: общая характеристика физико-химических свойств, механизма каталитического действия и источников ПА, особенности экспрессии гена, процессинга и фолдинга ПА и клетках *E.coli*; практическое применение ПА, а также

общие сведения о экспрессии и фолдинге рекомбинантных белков, описание работ по одноцепочечным и пермутированным белкам.

В разделе «Материалы и методы» приведен список реактивов, бактериальных штаммов и плазмид, использованных в исследовании, и описание экспериментальных методик и методов исследования. В работе были использованы современные разнообразные физико-химические, биохимические, микробиологические методы, а также методы генной инженерии, биотехнологии и ферментативной кинетики, в том числе спектрофотометрическое определение активности фермента и концентрации общего белка, гидрофобная и ионообменная хроматография для очистки белков, методы аналитического и препаративного электрофореза ДНК и белков, культивирование бактериальных штаммов-продуцентов, полимеразная цепная реакция, бактериальная трансформация компетентных клеток, дифференциальная сканирующая калориметрия, компьютерное моделирование структуры белка, выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, секвенирование ДНК, рефолдинг, титрование активных центров фермента необратимым ингибитором. Широкий набор методов позволил диссертанту решить все задачи работы.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из двух частей и содержит подробное описание проведенных экспериментов и интерпретацию результатов работы. Первая часть диссертации включает культивирование рекомбинантных штаммов, несущих плазмиду с геном определенной мутантной формы, которые были отобраны при клонировании ПА с геномной ДНК штамма *A. faecalis*, и изучение структурно-функциональной взаимосвязи между обнаруженными случайными аминокислотными заменами и каталитическими свойствами и стабильностью белка. Было показано, что аминокислотные замены, несмотря на разнообразный характер их локализации в структуре белка и при неизменности каталитической эффективности, влияют на количество синтезированного рекомбинантного белка в клетке *E. coli*, на кинетические параметры и часто ухудшают термостабильность. На основании этих результатов диссертант делает вывод о том, что изученные мутантные формы не являются перспективными для практического применения. Детально были изучены свойства ПА дикого типа, включая кривые ДСК, кинетику термоинактивации и зависимость констант скорости инактивации от широкого ряда параметров: рН, концентрации буферного раствора и температуры реакции инактивации. Во второй части диссертации представлены данные по получению и характеристике двух вариантов одноцепочечной формы ПА из *A. faecalis*, в частности, проведено компьютерное моделирование линкеров и типа сшивки двух субъединиц, получены генно-инженерные конструкции методом ПЦР,

проведена масштабная оптимизация условий культивирования, выделения и очистка двух ферментов, изучение их свойств. Было показано, что обращенный порядок расположения кодирующих участков для α - и β -субъединицы в структуре гена не отразился на функциональных свойствах фермента, практически не изменились кинетические характеристики, но при этом незначительно снизилась термостабильность. Эти отличия автор связывает с неоптимальными условиями рефолдинга и формирования дисульфидной связи, что обусловлено цитоплазматической локализацией продукта экспрессии гена одноцепочечной ПА.

Выводы диссертационной работы грамотно сформулированы и обоснованы и подтверждают новизну и значимость полученных результатов.

Необходимо отметить высокий уровень изложения материалов диссертационной работы Степашкиной А.В. Диссертация написана понятным научным языком и практически не содержит грамматических ошибок, хорошо оформлена, текст сопровождается подробными и в то же время наглядными таблицами, графиками и рисунками, что выгодно дополняет диссертацию и способствует более осмысленному пониманию обзора литературы и результатов работы.

По прочтении диссертационной работы Степашкиной А.В. возникли следующие замечания.

1. В разделе «Материалы и методы» отсутствует описание методики выделения геномной ДНК штамма *A.faecalis*, что важно для анализа результатов работы.

2. В разделе «Результаты и их обсуждение», подраздел 4.1.1 - Клонирование гена пенициллинацилазы из *A.faecalis*, с. 87 – недостаточно полно описаны условия эксперимента, в частности отсутствуют сведения о структуре праймеров для клонирования, не объясняется наличие в составе праймеров сайтов *HindIII* и *EcoRI*.

Конечно, эти замечания носят частный характер и никоим образом не сказываются на высоком уровне работы и достоверности полученных результатов и выводов диссертационной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертационной работы отражены в публикациях и автореферате. По материалам работы имеется 14 публикаций, включая статьи и тезисы докладов международных и российских конференций, в том числе три публикации в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК РФ.

Содержание автореферата.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Заключение.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование в области белковой инженерии, биохимии и биотехнологии, обладает несомненной актуальностью и содержит новые результаты, имеющие большое теоретическое и практическое значение, соответствует паспортам специальностей 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в пунктах 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции № 335 от 21 апреля 2016 г.). Диссертант Степашкина Анастасия Владимировна, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Директор ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии, доктор биологических наук, профессор

А.С. Яненко

Подпись д.б.н., проф. А.С. Яненко заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
кандидат химических наук, доцент



Т.Л. Воюшина

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

117545 Россия, Москва 1-й Дорожный проезд, д. 1.

Тел. +7 (495) 315-12-47, +7 (495) 315-01-83, +7 (495) 315-37-47

Электронный адрес официального оппонента: yanenko@genetika.ru

29.11.2017