



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@imb.ru](mailto:isinfo@imb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

Исх. № 12312-9311/2  
28 11 2017 г.

УТВЕРЖДАЮ  
Зам. директора Института  
молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН,  
член-корреспондент РАН  
В.Л. Карпов



2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации 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).

Современная медицина и фармакология на стадии создания новых лекарственных препаратов для лечения конкретного заболевания использует разные подходы, среди которых методы биотехнологии позволяют получать тот или иной препарат в более мягких условиях по сравнению с химическим синтезом и обеспечивают высокую чистоту и эффективность лекарственного средства. Антибиотики с момента их открытия играют важную роль в терапии заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами. Следует сказать, что проблема приобретенной антибиотикорезистентности, с которой сталкивается современная медицина, требует быстрого поиска новых антибиотиков более широкого спектра действия. Среди класса антибиотиков можно выделить большую группу  $\beta$ -лактамных антибиотиков, значительная доля которых получается ферментативным путем из исходных природных синтонов – 6-аминопенициллановой кислоты и различных форм

7-аминодезацетоксицефалоспоровой кислоты и искусственно синтезированного ацильного донора при помощи пенициллинацилазы (ПА) - фермента класса гидролаз, подкласса амидогидролаз.

Несмотря на то что главная область применения ПА относится к получению полусинтетических  $\beta$ -лактамных антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов и их аналогов, например, лоракарбефа), этот фермент успешно применяется для получения энантиомеров  $\beta$ -аминокислот и других хиральных структурных элементов, входящих в состав лекарственных препаратов, содержащих определенный оптический изомер. Среди них можно выделить ингибитор рецепторов тромбоцитов ксемилофибан, противоопухолевые препараты группы циклопентапептидов астины, а также пилорицидины, новые антибиотики анти-*Helicobacter pylori*. Таким образом, ПА является биотехнологически важным ферментом, позволяющим получать лекарственные средства различных фармакологических групп. Разработка новых биокатализаторов на основе пенициллинацилазы представляет актуальную задачу для фармацевтической промышленности, биотехнологии и медицины. Из вышесказанного однозначно следуют высокая актуальность и большая практическая значимость исследования, выполненного диссертантом.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. посвящена изучению ПА из бактерии *Alcaligenes faecalis*, а именно экспрессии и характеристике мутантных форм ПА, полученных ранее при клонировании нового патентно-чистого гена фермента дикого типа с геномной ДНК бактериального штамма *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM), подробному анализу физико-химических свойств ПА дикого типа, а также получению и характеристике свойств одноцепочечной формы фермента. Среди положений, выносимых на защиту, были установлены актуальные и представляющие фундаментальный научный интерес гипотезы, которые последовательно обосновываются и изучаются в диссертационной работе Степашкиной А.В.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: 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.

Обзор литературы состоит из тринадцати подразделов и дает подробное описание



основных сведений о пенициллинацилазе, особенностях процессинга и фолдинга ПА при экспрессии гена в *E.coli*, ее стабильности и методах очистки, содержит анализ литературных данных относительно культивирования штаммов-продуцентов ПА в разных типах систем экспрессии, описано практическое применение ПА, а также общее представление об экспрессии и фолдинге рекомбинантных белков и их рефолдинге из телец включения, о пермутированных и одноцепочечных белках. Обзор литературы содержит сводные таблицы, которые делают изложение литературных данных более наглядным и понятным. В целом Обзор литературы дает детальное представление о состоянии мировой научно-исследовательской деятельности по теме диссертации и формирует подробную теоретическую базу для обоснованной постановки целей и задач диссертационной работы Степашкиной А.В.

В разделе «Материалы и методы» описаны реактивы и бактериальные штаммы, протоколы экспериментальных методик и современные физико-химические методы исследования белков, методы генной инженерии, биохимии, микробиологии, молекулярной биологии и биотехнологии, использованные в диссертационной работе Степашкиной А.В., что говорит о высокой профессиональной компетентности автора и о высоком научном уровне выполненной экспериментальной работы. Большое количество приведенных методов исследования не оставляет сомнения в достоверности полученных данных.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из двух основных глав.

В первой главе подробно обсуждаются результаты экспрессии и характеристика рекомбинантной пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* дикого типа и ее мутантных форм со случайными мутациями, полученных при клонировании. В частности, описано секвенирование плазмид и сравнительный анализ полученных последовательностей, экспрессия мутантных форм рекомбинантной ПА в *E.coli*, сравнительное изучение каталитических свойств и термостабильности мутантных ПА, и в заключительных подразделах подробно исследована термостабильность ПА дикого типа методом изучения кинетики термоинактивации при разных температурах, зависимости величины константы скорости инактивации от рН буферного раствора, его состава и ионной силы, и изучена термостабильность ПА дикого типа методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Главной задачей первой части работы было изучение роли случайных

многоточечных нуклеотидных, а также соответствующих им аминокислотных замен на уровень экспрессии, кинетические свойства и температурную стабильность мутантных форм ПА. Работу начинали при наличии готового музея с несколькими клонами. Секвенирование выделенных из соответствующих клонов плазмид показало наличие многоточечных нуклеотидных замен в гене ПА дикого типа, приводящих к замене от одного до трех аминокислотных остатков. Случайные аминокислотные замены имели различный характер и пространственное расположение в трехмерной структуре фермента. Эксперименты по экспрессии рекомбинантных штаммов-продуцентов показали, что уровень биосинтеза рекомбинантного белка заметно отличался для определенной мутантной формы, что подтверждает его зависимость от наличия аминокислотных замен в ферменте дикого типа. Сравнительное изучение свойств мутантных форм показало, что мутации в гене фермента приводят к изменению величин кинетических параметров, как каталитической константы, так и константы Михаэлиса при неизменности величины каталитической эффективности, а также к преимущественному ухудшению температурной стабильности.

Вторая часть диссертационной работы Степашкиной А.В. закономерно вытекает из результатов первой части и является ее логическим продолжением. Белковая инженерия и направленный мутагенез в рамках научно-исследовательской работы в масштабах лаборатории требует наличия рекомбинантного препарата белка в количествах, достаточных для изучения его свойств, в том числе и для характеристики термостабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии, где эти количества должны быть в районе 10-20 мг очищенного белка. Учитывая результаты первой части работы, можно заключить, что направленный мутагенез может ухудшать уровень биосинтеза белка на стадии культивирования рекомбинантного штамма-продуцента. Данный факт связан с наличием посттрансляционного процессинга. Чтобы избежать подобной зависимости от процессинга, в диссертационной работе Степашкиной А.В. было предложено получить одноцепочечную форму фермента, биосинтез и фолдинг которой протекает в цитоплазме клетки *E.coli* в отсутствие процессинга. Новая генно-инженерная конструкция, полученная в работе, обуславливает обратный порядок фолдинга доменов псевдодимерной одноцепочечной ПА и иную конечную локализацию в клетке *E.coli* продукта экспрессии гена одноцепочечного фермента. С теоретической точки зрения и на основании анализа опубликованных



экспериментальных статей по одноцепочечным и пермутированным белкам, можно утверждать, что предложенная генно-инженерная конструкция не должна изменять третичную структуру одноцепочечной ПА и в том числе конформацию активного центра, что должно обеспечивать сохранение биологической функции и свойств нового фермента. Однако цитоплазматическая локализация белка, учитывая наличие дисульфидного мостика внутри  $\beta$ -субъединицы в молекуле ПА дикого типа и особенности окислительно-восстановительного потенциала цитоплазмы клетки *E.coli*, ставит под сомнение сохранение дисульфидной связи и, следовательно, температурной стабильности одноцепочечной ПА.

Для достижения поставленной цели получения одноцепочечного белка во второй части диссертационной работы Степашкиной А.В. было проведено компьютерное моделирование и получены генно-инженерные конструкции, кодирующие два варианта одноцепочечной формы ПА. В качестве линкера, образующего соединительную петлю, была выбрана аминокислотная последовательность из двух одинаковых блоков, которая успешно применяется для соединения легкой и тяжелой цепей антител и в ряде других случаев. Отличия между одноцепочечными вариантами заключались в наличии или отсутствии остатка пролина в 551-м положении на С-конце  $\beta$ -субъединицы. Предполагалось, что наличие остатка пролина придает жесткость полипептидной цепи в районе линкера, уменьшая конформационную подвижность и обеспечивая более высокую термостабильность по сравнению вариантом, в котором этот остаток пролина отсутствует. Изучение свойств полученных вариантов одноцепочечной ПА показало, что ковалентное соединение двух субъединиц не влияет на каталитические свойства, но ухудшает термостабильность фермента, что подтвердило исходные теоретические предположения. Единственным существенным отличием ПА дикого типа от ее одноцепочечной формы являлся уровень биосинтеза и особенности экспрессии в зависимости от температуры культивирования. В диссертационной работе Степашкиной А.В. проведена объемная работа по оптимизации экспрессии одноцепочечной ПА, и было показано, что оптимальные условия культивирования, в основном температура и длительность, отличаются для гетеродимерной и одноцепочечной форм ПА. При этом культивирование в оптимальных условиях для каждого фермента обеспечивает более высокий выход активной и растворимой ПА дикого типа по сравнению с ее одноцепочечной формой. Также был выполнен анализ растворимой и нерастворимой фракции белка клетки,

рефолдинг одноцепочечных вариантов ПА из телец включения, разработка методики очистки и характеристика вариантов одноцепочечной формы ПА.

Обсуждение результатов работы сопровождается соответствующими рисунками, графиками и таблицами. Следует отметить аккуратное и наглядное изображение и систематизацию экспериментальных данных на иллюстративном материале, что способствует более полному и четкому пониманию полученных результатов.

По разделу «Результаты и их обсуждение» имеются следующие вопросы и замечания:

1. В первой части автор исследовал свойства случайных мутантов ПА, однако впоследствии при получении одноцепочечного фермента ни один из этих мутантов использован не был.

2. При титровании активных центров возможен неспецифический гидролиз модифицирующего агента. Как автор минимизировал (или полностью предотвращал) этот процесс?

Сделанные замечания являются несущественными и никоим образом не влияют на достоверность и надежность полученных результатов, а также на выводы диссертационной работы.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. написана грамотным научным языком и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, обладающую несомненной научной новизной и практической значимостью. Степень достоверности представленных в диссертации данных и сделанных выводов и степень обоснованности научных положений не вызывает сомнений, так как они были доказаны экспериментально с применением современных методов исследования белков, а результаты были подробно проанализированы на основании теоретических положений фундаментальной науки. Выводы диссертации основаны на данных выполненных экспериментов.

По теме диссертации Степашкиной А.В. имеется всего 14 публикаций, три из которых – в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ. Результаты диссертационной работы докладывались на международных и всероссийских научных симпозиумах и конференциях. Автореферат и публикации полностью соответствуют основному содержанию диссертационной работы.

Диссертационная работа Степашкиной А.В. полностью соответствует критериям, изложенным в пп. 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.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, 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).

Полученные автором результаты могут быть использованы в научно-исследовательских институтах и лабораториях, занимающихся научной деятельностью в области биохимии, генной инженерии и биотехнологии – в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт», Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, в Научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, на биологическом и химическом факультетах и факультете биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Отзыв был заслушан и одобрен 22 ноября 2017 г. на заседании лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Отзыв составил заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений, ИМБ РАН, член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор



С.Н. Кочетков

«22» ноября 2017 г.

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН).

Лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений,  
тел. +7 (499) 135-05-90,  
e-mail: kochet@eimb.ru