

ОТЗЫВ

Официального оппонента по диссертации **Панина Николая Владимировича** «Направленный мутагенез пенициллинацилазы из *E.coli* для изменения каталитических свойств и стабильности», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.15 – химическая кинетика и катализ и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа Панина Н.В., представленная на защиту, посвящена исследованию влияния индивидуальных аминокислотных остатков, входящих в состав полипептидной цепи белка пенициллинацилазы из *Escherichia coli*, на активность, специфичность и стабильность рекомбинантного фермента.

Процесс формирования белковой полипептидной цепью биологически активной третичной пространственной структуры (фолдинг) часто называют «третьей составляющей генетического кода». Известно, что даже точечные мутации способны критически изменять физические и ферментативные свойства белков. Исследование роли аминокислотных остатков в формировании стабильной белковой глобулы и конформации активного центра, осуществляющего каталитические превращения субстрата – важнейшая фундаментальная проблема белковой химии, многие детали которой до сих пор плохо изучены. Даже самые современные структурные методы не способны дать исчерпывающую информацию о том, к каким изменениям может привести замена боковой цепи аминокислоты. Поэтому любые гипотезы, сделанные с помощью биоинформатики и моделирования на основе данных рентгеноструктурного анализа, требуют прямого экспериментального подтверждения. Особенно важны исследования роли спонтанных и направленных мутаций для белков, имеющих практическое значение в биотехнологических приложениях. Пенициллинацилазы, осуществляющие высокоточный гидролиз природных пенициллинов, рассматриваются как чрезвычайно перспективный инструмент для получения бета-лактамовых «каркасов» при разработке новых антибиотиков. Получение мутантов фермента, обладающих повышенной активностью, селективностью и/или стабильностью в широком диапазоне физических условий позволяет решить немало проблем в случае внедрения метода в практическое фармакологическое производство.

Таким образом, подробное экспериментальное исследование деталей строения глобулы пенициллинацилазы *E.coli* и роли индивидуальных аминокислотных остатков, координирующих субстрат и осуществляющих катализ, оказывается как важной с точки зрения фундаментальной науки, так и актуальной практической задачей.

Для решения задачи поиска ключевых аминокислотных остатков и выявления их роли в ферментативном катализе пенициллинацилазой диссертантом была предложена четкая и логичная экспериментальная схема, включающая в себя: поиск и сравнение родственных последовательностей в генетических базах данных, разносторонний биоинформационный анализ, позволяющий выбрать «горячие точки» перспективного мутагенеза, получение генов мутантных форм методом полимеразной цепной реакции, биосинтез и очистку рекомбинантных мутантных белков, и подробное исследование их биологической активности. Таким образом, помимо выяснения деталей стабилизации третичной структуры фермента, диссертанту удалось получить мутантные пенициллинацилазы с многократно увеличенными по сравнению с природной формой эффективностью (мутант bF256R/aR145G) и стереоселективностью (мутант bF71A) ацилирования, а также операционной стабильностью в щелочных условиях (мутант bD484N).

Диссертация Н.В. Панина представлена в традиционном изложении и состоит из введения (4 стр.), обзора литературы (55 стр.), экспериментальной части («материалы и методы») (16 стр.), результатов и обсуждения (80 стр.), выводов, списка цитируемой литературы, включающего 151 наименование, и 4 справочных приложений. Работа изложена на 200 страницах текста, содержит 67 таблиц и 76 рисунков.

Обзор литературы представляет собой очень детальное изложение современных данных о важнейших вопросах, связанных с диссертационной работой: аминокислотным последовательностям и структурам бактериальных пенициллинацилаз, их каталитической активности, субстратной и энантиомерной селективности, молекулярных аспектах функционирования активного центра и участков связывания субстрата, а также обобщение и сравнение методов белковой инженерии. Подробность изложения свидетельствует о серьёзности и глубине проведённой диссертантом работы по планированию стратегии исследования и интерпретации своих экспериментальных данных. Следует лишь отметить высокую перегруженность текста аббревиатурами, некоторые из которых встречаются в тексте всего 1-2 раза, но для расшифровки которых приходится возвращаться к списку сокращений. Это создаёт определенные трудности при чтении и анализе работы. Композиционные огрехи, однако, не подвергают сомнению высокую квалификацию автора в своей научной области.

Раздел «Материалы и методы» (с приложениями) включает широкий набор привлечённых для целей исследования современных методов биохимического и энзимологического эксперимента, а также компьютерного моделирования, биоинформационного и статистического анализа. Все применённые в работе методики приведены с уровнем детализации, достаточным для независимого воспроизведения в лаборатории. Все экспериментальные и биоинформационные подходы описаны и обсуждены по мере их применения в работе, диссертант хорошо обосновывает выбор методов исследования, и их уровень соответствует современному мировому уровню.

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит исчерпывающее описание каждого выполненного этапа работы: аргументация выбора точек мутагенеза, получение 27 различных мутантов пенициллинацилазы *E.coli* с помощью двух стратегий полимеразной цепной реакции, выделение и очистку рекомбинантных белков, определение параметров активности, селективности и стабильности мутантных ферментов, анализ закономерностей выявленных свойств пенициллинацилаз каждой из выбранных для исследования групп мутагенеза.

Основные результаты и выводы работы полностью охватывают поставленные в начале работы цели и задачи исследования. Пять выводов работы полностью соответствуют поставленным в начале работы задачам, точно отражают содержание работы, и позволяют считать основную цель работы вполне достигнутой. В качестве замечания можно указать довольно расплывчатую формулировку вывода 1. На что делается акцент? На количество сконструированных мутантов или на то, что мутагенез изменяет свойства фермента?

Другие немногочисленные замечания касаются в основном композиции и оформления работы. Так, например, иллюстрации, изображающие области белковой структуры, в которых производили мутагенез, слишком мелкие. Из текста и иллюстрации не всегда понятно, какими соображениями руководствовался диссертант при планировании конкретной аминокислотной замены? Почему остаток фенилаланина заменяется в одном случае на аланин, в другом – на лейцин, а в третьем – на аргинин? При том, что в рукописи диссертации на страницах много пустого пространства, можно было бы вставить более крупные картинки моделей в нескольких проекциях, для большей наглядности. Использованный принцип выделения подписей к рисункам и таблицам бледным шрифтом достаточно спорный для удобства чтения. Расшифровка многочисленных аббревиатур находится в двух местах текста – частично на с. 7-10, частично на с.71 (для сокращений, относящихся к методической части).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что труд Н.В. Панина является перспективным направлением в науке и практике для использования в теоретических и практических целях. Работа проведена на современном методическом уровне, актуальна, отличается несомненной новизной. Разработанная система подходов и методов позволяет рекомендовать их в качестве образцового алгоритма исследований подобных объектов. Диссертация Николая Владимировича Панина представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную под руководством д.х.н., профессора В.-Ю. К. Шведаса и к.х.н., в.н.с. Д.Ф. Гуранды.

Автореферат диссертации Н.В. Панина и опубликованные им материалы достаточно полно отражают содержание данного труда. Обнаруженные недочеты ни в коей мере не снижают ценности выполненного Н.В. Паниным исследования. Диссертантом проделан значительный объем работы, получены новые интересные данные, которые внесли существенный вклад в понимание процесса ферментативного катализа, осуществляемого пенициллинацилазами.

На основании вышеизложенного считаю, что рецензируемая диссертация Н.В. Панина на тему: «Направленный мутагенез пенициллинацилазы из *E.coli* для изменения каталитических свойств и стабильности» отвечает требованиям п. 7 Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а сам автор заслуживает присуждения ему степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.15 – химическая кинетика и катализ и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии
ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»
доктор химических наук
Мирошников Константин Анатольевич

Подпись Мирошников Константина Анатольевича заверяю.
Ученый секретарь ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»
доктор физико-математических наук
Олейников Владимир Александрович



23.09.2014