

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента**

**диссертационной работы Панина Николая Владимировича:  
« Направленный мутагенез форм пенициллиназы из *Escherichia coli* для изменения каталитических свойств и стабильности»,  
представленной на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**

**по специальностям: 02.00.15 – кинетика и катализ; 03.01.06 –  
биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

Напряженная эпидемическая ситуация по туберкулезу, другим заболеваниям и возросшая устойчивость возбудителя к лекарственным препаратам диктуют настоятельную необходимость поиска и разработки новых эффективных средств медикаментозной борьбы с болезнями. В арсенале у медиков имеется целый ряд новых лекарственных препаратов, однако пенициллину и другим  $\beta$ -лактамым антибиотикам пока нет альтернативы и это лишь стимулирует исследователей к поиску новых более эффективных соединений пенициллинового ряда. Пенициллинацилаза из *Escherichia coli* (есПА) способна катализировать обратимую реакцию гидролиза амидной связи в пенициллине G с образованием 6-аминопенициллиновой кислоты, что широко используется в промышленном производстве антибиотиков. В тоже время она может использоваться и при получении новых полусинтетических антибиотиков в качестве катализатора взаимодействия активированного ацильного донора с ядрами пенициллинов и цефалоспоринов, разделении рацематов, пептидном синтезе и др. Роль этого фермента постоянно растет и его практическое использование не ограничивается химией антибиотиков, а постепенно распространяется на получение энантиомеров широкого круга аминсоединений – небелковых аминокислот, аминспиртов,



первичных аминов и полиаминов. Таким образом, использование данного фермента становится рутинным методом синтетической органической химии.

В тоже время ограниченная субстратная специфичность и стереоспецифичность фермента дикого типа, разнообразные осложнения реакций синтеза, гидролиз и низкая стабильность в щелочной среде пока ограничивают его более широкое применение. В этой связи использование методов белковой инженерии для направленного изменения важнейших свойств фермента является очень важной задачей и обсуждаемую тему диссертационной работы следует признать весьма актуальной.

В последнее время широко исследуются вопросы возможности проявления известными ферментами более широкой субстратной специфичности в традиционной водной среде и поэтому изучение биокаталитических свойств новых видов пенициллинацилаз (ПА) одна из интереснейших задач современной биоорганической химии. Сейчас, когда вопросы экологии приобретают все более важное значение при определении наиболее рациональных методов получения, расщепления и выделения ценных физиологически активных препаратов, детальное исследование факторов влияющих на эффективность синтеза и разделения энантиомеров приобретает решающее значение. Однако для того, чтобы это стало реальностью, необходима огромная подготовительная работа по получению и изучению свойств этих биокатализаторов.

Диссертация Панина состоит из трех глав: литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения. Изложение работы завершают пять выводов и список использованной литературы (151 ссылки). Представленный весьма обширный текст диссертации (200 страниц) содержит большой и удобный для использования и анализа иллюстрационный материал (67 таблиц, 76 рисунков, 2 диаграммы, 5 схем и 20 стр. дополнения, где приведены используемые праймеры и программы).

Описанию результатов собственных исследований в диссертации традиционно предпослан литературный обзор, охватывающий 108 ссылок на работы преимущественно последнего десятилетия. В обзоре кратко представлены общие



сведения о пенициллинацилазе, основные области применения и белковая инженерия и поиск новых ПА.

При рассмотрении общих сведений о ферменте автор осуществил анализ литературы, посвященный изучению структуры и каталитических свойств пенициллинацилаз. Кратко рассмотрена физиологическая роль ПА, каталитический механизм действия, субстратная специфичность ферментов этого семейства и стереоспецифичность, а также основные области применения пенициллинацилаз. Далее рассматриваются структурно-функциональные особенности есПА, причем более подробно конформационные переходы в активном центре и продуктивные сайты связывания (участки связывания) ацильной, амидной части и бета-лактамных нуклеофилов. Самое главное, что анализ литературных данных позволяет автору выявить тот круг аминокислотных остатков в районе активного центра пенициллинацилазы, замена которых представляет интерес с точки зрения изменения каталитических свойств, субстратной специфичности и энантиоселективности фермента.

Далее диссертант рассматривает современные подходы белковой инженерии в поиске новых эффективных во многих параметрах ПА, анализирует три основополагающие стратегии; включающие поиск природных катализаторов, создание биокатализатора *de novo* и суть белковую инженерию. Вначале подробно анализируются известные данные по каталитической активности и субстратной специфичности для ряда природных ПА (которых известно уже более 40) и делается вывод о есПА, как о наиболее практически привлекательном природном объекте для дальнейшего мутагенеза.

Важной составной частью литературного обзора является рассмотрение и анализ последних достижений белковой инженерии ПА – современные подходы случайного и направленного мутагенеза, а также известные комбинированные методы и консенсусный подход. Весьма ценно, что Н.В.Панин не только перечисляет известные предложенные мутации, но именно анализирует их результат, критически рассматривая возможность их дальнейшего использования, приходя к выводу о перспективе



применения в дальнейшем современных комбинированных методов от которых можно ожидать не только аддитивности, но и синергизма ожидаемых эффектов.

В заключительной части литературного обзора автор делает вывод о свойствах новых природных и полученных с помощью белковой инженерии ПА, многие из которых, обладая каким-либо полезным свойством, отличным от есПА дикого типа, утрачивают другие не менее ценные, например, приобретая преимущества в эффективности синтеза, теряют в каталитической активности. Панин резюмирует, что имеющиеся литературные данные о каталитических свойствах мутантов пенициллинацилазы показывают об отсутствии четких сведений относительно влияния мутаций на повышение стереоселективности пенициллинацилазы по отношению к ряду аминов и аминокислот при стабильности в щелочной среде и т.д.

Обзор достаточно подробен, критичен и, несомненно, отвечает своему назначению. Его структура облегчает чтение и оценку основной главы диссертации, помогает понять формулирование целей исследований автора, мотивацию выбранных направлений приложения усилий, степень новизны предлагаемых решений. Обзор завершает постановка задачи, демонстрирующая оригинальность выбранного диссертантом подхода и перспективность данного исследования.

Обсуждение результатов диссертации предваряет экспериментальная часть, которая показывает большой объем работы, лично проведенной автором. Четкость и полнота изложения материала соответствуют и этому разделу диссертации. Здесь весьма обстоятельно изложены использованные экспериментальные методы по получению мутантных форм пенициллинацилазы из *E.coli*. Подробно рассмотрено проведение мутагенеза, наработка биомассы, выделение и очистка мутантных форм пенициллинацилазы, определение активности и концентрации активных центров полученных мутантных пенициллинацилаз, исследование рН, термостабильности и инактивации, определение параметров S/N,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , количественное определение компонентов реакционной смеси методом ВЭЖХ-анализа, определение стереоселективности реакций ацилирования 2-аминобутанола, фенилаланинола и ферментативного гидролиза фенацетилфенилаланинола. Этот раздел свидетельствует о хороших экспериментальных навыках автора, высоком уровне проводимых



кинетических исследований и подтверждает достоверность результатов диссертационной работы.

Глава обсуждения результатов состоит из нескольких взаимосвязанных основных частей.

Вначале подробно рассмотрен выбор горячих точек мутагенеза – одиночных мутаций, распределенных по всей структуре фермента и стратегия объединения данных мутаций. Для введения мутаций в ген *esPA* в работе использовали сайт-направленный ПЦР, причем часть мутантов получена по схеме ПЦР мутагенеза, а другая по классической схеме с перекрытием. После подготовки праймеров и оптимизации условий ПЦР автор провел сравнение результатов применения двух методик, которые хорошо дополняют друг друга. Для всех полученных мутантов, а это более 30 клонов проведено определение активности, рН- и термостабильности, кинетические параметры гидролиза *m*-карбокси-*p*-нитроанилида фенилуксусной кислоты, комплексные кинетические параметры синтеза антибиотика ампициллина.

Основные результаты работы заключаются в следующем. Автором были получены 27 новых активных мутантных форм *esPA*, причем им запланировано и во многих случаях реализовано образование новых мутантных форм, улучшающих важнейшие свойства фермента – эффективность, каталитическую активность, стабильность в щелочной среде, стереоселективность, при сохранении других практически ценных параметров. Так, мутация bF256R, особенно в комбинации с мутацией aR145G, рекомендована диссертантом для значительного улучшения параметров S/H и  $\beta$ , т.е. повышения эффективности синтеза, мутации bD484N для повышения стабильности фермента, Исключительной удачей автора является находка возможности продуктивной замены N-концевого остатка bS1 серина на треонин, одиночная реализация которой, ранее не приводила к успеху. Для этого была предложена и осуществлена аналогичная обратная замена соседнего остатка bT68 в мутанте bS1T+ bT68S. Полученный Паниным путем введения двойной мутации bS1T + bT68S мутант обладает более высокой каталитической активностью по сравнению с диким ферментом и более высокими значениями параметра (S/H) и стереоселективности (Es);



Среди результатов диссертационной работы Панина хотелось бы выделить исследование эффективности и стереоселективности мутантных форм в реакции ацильного переноса на высокоосновные первичные аминосоединения – аминоспирты: алифатического 2-аминобутанола и ароматического фенилаланинола, а также в реакции гидролиза фенацетильного производного фенилаланинола. Данные вещества медицинского назначения практически важны. Первый в оптически чистом виде используется в синтезе важнейшего противотуберкулезного препарата первого ряда - этамбутола, другой применяется в лечении заболеваний ЦНС, причем оба ввиду относительной доступности применяются для разделения рацематов разнообразных ценных веществ на оптические изомеры. Здесь диссертантом получены весьма ценные результаты. Для мутанта bF71L Панин наблюдал почти 5-кратное увеличение стереоселективности в реакции ацилирования аминобутанола амидом R-миндальной кислоты, при этом 15 кратное улучшение параметра S/N и 5-ти кратное улучшение каталитической активности при лишь небольшом снижении термостабильности. Очень ценно в практическом смысле для дальнейших исследований, что для данного мутанта при ацилировании аминобутанола амидом S-миндальной кислоты наблюдается инверсия активной формы и более активным является противоположный R-энантиомер. Диссертант установил, что при ацилировании амидом R-миндальной кислоты фенилаланинола наряду с увеличением параметра S/N на порядок и существенным увеличением скорости процесса наблюдается еще более значительное увеличение стереоселективности чем для алифатического аминоспирта. В итоге мутантная форма bF71A может рассматриваться как потенциальный катализатор получения отдельных энантиомеров данных аминоспиртов в чистом виде.

Вполне в рамках современных подходов для объяснения полученных результатов Н.В.Панин провел множественный докинг образующихся отдельных энантиомеров манделилфенилаланинола в структуры ферментов есПА ДТ и bF71A, который позволил оценить разницу средней рассчитанной энергии связывания этих энантиомеров в 0.5 ккал/моль.

Естественным пожеланием диссертанту будет, чтобы полученные результаты явились лишь начальным этапом работ по изучению широкого круга субстратов, в



частности других функционализированных аминов, хиральных ди и триаминов и других нуклеофильных соединений.

Обсуждаемая работа – важный и необходимый этап исследований, проводимых на высоком современном уровне и посвященных изучению поведения мутантов пенициллинацилазы. В результате автору удалось показать, что активность, стабильность и ряд других свойств позволяют отнести некоторые новые мутанты к перспективным экологически приемлемым биокатализаторам, работающим в водных средах.

Оппонент не имеет принципиальных претензий к выполненной работе и ограничивается указанием на некоторые недостатки их письменного представления.

Так, в диссертации приведен обширный (на 5 стр.), возможно слишком большой список сокращений, общепризнанных в мировой литературе, который будучи широко применяемым в манускрипте, фактически определяет особый язык диссертации. Однако, для более удобного восприятия этой важной работы широким кругом специалистов и рецензентов, в названиях отдельных разделов сокращений можно было избежать. Встречаются неточности и в сокращениях: п-G и Пеп-G. Замечены опечатки: диастириомер вместо диастереомер с. 82. В тексте в ряде случаев на одной схеме (стр.111) используется сочетание двух номенклатур: (D,L) и (S,R) в названии соединений.

В работе хотелось бы также видеть больше примеров, демонстрирующих преимущества мутантов при проведении препаративного синтеза оптически активных аминов и аминоспиртов.

Совершенно очевидно, что эти замечания, в основном, относятся к форме написания диссертационного труда, а не к существу полученных результатов. Диссертационная работа Н. В. Панина является прекрасным квалификационным и законченным научным исследованием, приведшим к важным научным результатам, достоверность которых не вызывает сомнений. Выводы убедительны и хорошо обоснованы. Автореферат и научные публикации автора полностью отражают основное содержание диссертации. Результаты диссертационной работы не только опубликованы



и представлены на ведущих мировых конференциях по биокатализу, но и защищены патентами.

Полученные Паниным результаты вносят существенный вклад в поиск мутантных препаратов пенициллинацилазы из *E.coli* с увеличенной стереоселективностью, каталитической активностью и стабильностью. Результаты исследования могут найти применение для получения хиральных аминоспиртов, выделения отдельных энантиомеров, а также в синтезе антибиотиков.

На основании всего вышеизложенного можно утверждать, что по актуальности, новизне и важности полученных результатов и выводов, их достоверности и доказательности, данная диссертационная работа соответствует требованиям п.8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Н. В. Панин, заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.15 – кинетика и катализ и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Официальный оппонент,

Доктор хим. наук,

Заведующий лабораторией ГРЭОС

ИНЭОС РАН, 119991, ГСП-1, ул.Вавилова, 28

Тел. 8-499-135-5033; факс: 8-499-135-5085;

e-mail:const@ineos.ac.ru

/ К. А. Кочетков/

Подпись доктора хим. наук, зав. лаб. К. А. Кочеткова заверяю

Нач. отдела кадров ИНЭОС РАН

/И. С. Овченкова/

