

## ОТЗЫВ

### На кандидатскую диссертацию Панина Николая Владимировича НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *Escherichia coli* ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СТАБИЛЬНОСТИ

Работа Панина Николая Владимировича посвящена изучению возможности применения рационального дизайна для улучшения каталитических свойств пенициллинацилазы. Пенициллинацилаза является хорошо изученным ферментом и известна, в основном, благодаря использованию в фармацевтической промышленности для получения ядер бета-лактамных антибиотиков. В тоже время широкая субстратная специфичность фермента по отношению к нуклеофильной части субстрата и уникальные каталитические свойства открывают возможности для применения фермента в биотехнологии. За последние 20 лет появилось много работ по изучению пенициллинацилазы в реакциях гидролиза и ацильного переноса в водной среде, в частности, в лаборатории профессора Швьдаса показана перспективность использования фермента для препаративного получения широкого круга оптически чистых аминсоединений и их N-ацильных производных. Тем не менее, создание действительно конкурентоспособных биотехнологических процессов на основе использования «неприродных» свойств пенициллинацилазы требует максимальной оптимизации не только условий проведения реакций и технологического процесса, но и свойств фермента.

**Цель исследования четко сформулирована. Задачи исследования конкретизированы и полностью решены в ходе работы.** Работа написана хорошим литературным языком, прекрасно оформлена, практически не содержит грамматических ошибок и опечаток.

Поиск и использование пенициллинацилаз из новых источников позволили добиться существенного улучшения отдельных параметров реакций, но не привел к принципиальному улучшению свойств катализатора. В тоже время рациональный дизайн пенициллинацилазы с использованием данных рентгеноструктурного анализа выявил некоторые закономерности зависимости свойств фермента от специфических

аминокислотных позиций и показал перспективность данного направления. Данную работу характеризует комплексный подход к анализу и изучению свойств пенициллинацилазы в зависимости от вызванных точечных мутаций. Автором были проанализированы данные предыдущих экспериментальных работ, а также привлечены результаты молекулярного моделирования и биоинформатического анализа, полученные недавно, для выявления наиболее перспективных с точки зрения рационального дизайна участков фермента. Важным результатом работы является то, что автору удалось усовершенствовать несколько несвязанных между собой свойств фермента, целенаправленно используя для мутагенеза различные участки фермента. Так мутация bF71A привела к 250-кратному увеличению стереоселективности реакции ацилирования фенилаланинола, в результате чего была достигнута величина ранее недостижимая для данного семейства ферментов. Стоит отметить, что мутагенез по позиции bF71 проводился и ранее, но уникальные свойства одного из мутантов были найдены только в данной работе и свидетельствуют о преимуществе использованного рационального подхода перед тривиальным скринингом мутантов. Введение двойной мутации bS1T + bT68S привело к получению уникального варианта фермента с каталитически активным N-концевым треонином вместо серина по активности и стабильности не уступающего, а по ряду других свойств превосходящего нативный фермент. Существенного улучшения стабильности пенициллинацилазы в щелочной среде автору работы удалось добиться с помощью точечной мутации bD484N, позволившей нейтрализовать отрицательный заряд карбоксильной группы аспарагина, возникающий в щелочной среде. Фактически, автор показал, что в пенициллинацилазе реализуется тот редкий случай, когда карбоксильная группа боковой цепи одной из аминокислот, обладающая нехарактерно высоким pK, находится в активном ферменте в протонированном состоянии и участвует в стабилизации третичной структуры. Стабильность пенициллинацилазы в кислой среде в меньшей степени, но также удалось



повысить с помощью мутации в другой позиции – bQ292R, дополнительно «укрепленной» заменой bI329E. Рациональный дизайн пенициллинацилазы с целью повышения эффективности фермента в синтезе бета-лактамов давно привлекает исследователей, но даже в этой области применения пенициллинацилазы автору удалось обнаружить новую позицию и соответствующую аминокислотную замену, приведшую к улучшению свойств. Мутант bF256R позволил почти в четыре раза увеличить скорость синтеза ампициллина, но ценой оказалась пониженная стабильность фермента.

Большинство найденных в работе, улучшающих свойства фермента мутаций являются независимыми, и, вероятно, могут быть комбинированы. Таким образом, результаты работы открывают возможности для получения действительно уникальных катализаторов на основе пенициллинацилазы.

В целом, можно сказать, что диссертационная работа Панина Николая Владимировича является законченным самостоятельным научным трудом, соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть представлена к защите.

Старший научный сотрудник

лаборатории радионуклидных и лучевых технологий

в экспериментальной онкологии

ФГБНУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохин»,

кандидат биологических наук

Е.Ю. Колдаева

Подпись к.б.н. Е.Ю. Колдаевой заверяю

ФГБНУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохина»,

Кандидат медицинских наук



И.Ю. Кубасова