

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен „Доктор” по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”, шифър: 01.05.10, озаглавен: „Ензим-субстратни взаимодействия в активния център на пеницилин G ацилаза. Кинетика и молекулно моделиране.”

Автор: Диана Александрова Жирякова, ИОХЦФ-БАН

Рецензент: проф. Райна Ботева, дхн,
(Национален Център по Радиобиология и Радиационна Защита, МЗ)

Дисертационният труд изследва реакционния механизъм на две бактериални пеницилин G ацилази, изолирани от *Escherichia coli* и *Alcaligenes faecalis*, със серия субстрати, фенилацетил-р-заместени анилиди. Субстратите са синтезирани от Диана Жирякова и са подбрани така че Хаметовите константи (σ_p) на заместителите да варират в широк интервал, от -0.26 до 1.27, с цел детайлен анализ на ефектите на заместителите върху кинетиката и механизма на хидролизната реакция. В интерпретацията на кинетичните резултати за ензима от *E. coli* са включени допълнителни, неизследвани от други автори вътрешномолекулни взаимодействия на активния серинов остатък (SerB1) с три аминокиселинни остатъци: AsnB241, AlaB69 и GlnB23, разположени в близост до активния център на ензима, което допринася за по-пълното охарактеризиране на преходните състояния и на скорост-определящите етапи на реакцията. Експерименталните резултати и квантово-механичното моделиране на активния център на ензима след отчитането на тези взаимодействия позволява да бъде предложен нов, модифициран модел на каталитичния механизъм. Проведен е също така сравнителен анализ на кинетичните свойства на двете бактериални пеницилин G ацилази (от *E. coli* и от *A. faecalis*), които са близки структурни и функционални хомолози, но се различават по субстратна специфичност и кинетични свойства. Охарактеризирани са нуклеофил-свързващите подцентрове на ензимите, приноса на конкретни функционални групи и атоми в реакционния механизъм, преходните състояния и скорост-определящите етапи на хидролизната реакция, което е оригинален и съществен научен принос за изясняване на каталитичния механизъм на тези ензими.

Пеницилин G ацилазите принадлежат към семейството на Ntn-хидролазите (N-terminal nucleophile hydrolases). Характерно за членовете на това семейство е, че въпреки значителната хетерогенност в аминокиселинните последователности, имат подобна пространствена организация, която се изразява в две централно, паралелно

разположени β -структури, „покрити” или „опаковани” от α -спирали. Всички ензими от това семейство се активират пост-транслационно и автокаталитично и съдържат разположен на N-края на полипептидната верига каталитичен нуклеофил, който хидролизира amidна връзка. Този активен остатък може да бъде серинов (при пеницилин ацилазите), треонинов (в протеазома) или цистеинов (в глутамин 5-фосфорибозил-1-пирофосфат амидотрансферазите). Всички Ntn-хидролази споделят еднакъв каталитичен механизъм и подобна конформация на активния център, но се различават съществено по субстратна специфичност.

Като се вземе предвид това, че Ntn-хидролази участват в протеазома, който разгражда около 80% от протеините в клетката и контролира всички важни биологични процеси, между които са генната експресия, транскрипцията, синтеза на протеини и ДНК и апоптозата, поради което инхибитори на протеазома се прилагат като анти-туморни и противовъзпалителни средства, може много ясно да се направи извод за важността и значението на изследванията върху каталитичния механизъм на групата ензими, към която принадлежат и бактериалните ацилази, обект на настоящия дисертационен труд. Конкретно ензимът пеницилин G ацилаза намира широко приложение в практиката като катализатор в синтеза на широк кръг антибиотици като амоксицилин, цефалексин и цефадроксил, поради което изследванията върху неговите каталитични свойства предствляват определен интерес за фармацевтичната индустрия. Използва се също така и в широк кръг синтетични и хидролизни реакции в лабораторната практика и получените в дисертацията резултати, които изясняват важни страни от ензимния катализ и детайлно характеризират нуклеофил-свързващите центрове на хомоложни пеницилин ацилази, представляват определен интерес и принос за практиката, науката и обществото.

Счита се, че бактериите синтезират и отделят пеницилин G ацилаза, за да могат да усвояват въглеродни източници от обкръжението си. Нови научни изследвания показват, че хидролази, близки хомолози на ацилазите, обект на настоящия дисертационен труд, участват и в процеси, свързани с комуникацията между бактериалните клетки. Това явление е известно като „quorum sensing” и е в основата на вирулентните свойства на бактериите. Сигнални молекули, производни на N-ацил хомосерин лактоните, които „изпълняват” комуникацията, са субстрати на тези хидролази. Разграждайки ги, ензимите инхибират бактериалната комуникация, блокират енергоемкия процес на конюгация и предотвратяват вирулентното поведение на патогените. Очаква се, че тези нови данни за биологичната роля на хидролазите ще

разширят областите на практическото им приложение в посока антимикробиални средства за борба с патогени и ще стимулират допълнително изследователския интерес към този клас ензими.

Дисертационният труд се състои от 86 страници и съдържа увод, литературен обзор, цел и задачи на изследванията, експериментална част, резултати и дискусия, и завършва с изводи. Литературният обзор е изчерпателен, съдържа пълна и подробна информация за структурни и кинетични изследвания върху пеницилин G ацилазите и демонстрира добрата литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата. Написан е компетентно и ясно и показва, че Д. Жирякова е много добре запозната с темата, която изследва, борави свободно и целенасочено с литературния материал. Подробно и изчерпателно са описани тридименсионалната структура на ензима, ролята на пропептида за нагъването във функционално активна форма на двете субединици А и В, които изграждат ацилазите и значението на калциевия йон за конформацията на ензима. Особено внимание е отделено на аминокиселинните остатъци, които формират активния център и допринасят за ензим-субстратните взаимодействия. Подробно се разглеждат и обсъждат приносите на редица важни аминокиселинни остатъци (PheB57, PheB24, PheA146, ArgA145, ArgB263, PheB71, MetA142 и TrpB154) за активността и каталитичните свойства на ензима. Изчерпателно са описани стадиите и междинните състояния на хидролизната реакция. Информацията, която се съобщава, не е механичен сбор от факти и данни, а е добре осмислена и показва отношението на автора на дисертационния труд към изследванията по въпроса от други автори. Литературната справка логично препраща към основната цел на дисертацията: идентифициране на важни за каталитичния механизъм, но неизследвани взаимодействия в активния център на пеницилин G ацилаза и охарактеризиране на приноса им в хидролизната реакция и сравнителен анализ на основните кинетични свойства на структурно хомоложни ацилази с различен бактериален произход. Конкретните задачи за изпълнение са формулирани ясно, кратко и точно. Експерименталната част също е написана професионално и компетентно.

Резултатите и дискусията са обединени в един раздел. Междинните състояния по пътя на превръщането на фенилацетил анилидите до 6-аминопенициланова киселина с участието на пеницилин G ацилаза са онагледени в три схеми (Схема 2, 3 и 4). Експериментално получените кинетични параметри са съобщени в две таблици (Таблица 5 и Таблица 8). Анализът на кинетичните характеристики показва, че и при двете бактериални пеницилин G ацилази, р-заместителят в напускащата група не оказва

влияние върху свързването на субстрата, но повлиява реакцията чрез електронните си свойства. За всички субстрати стойностите на Михаелисовите константи (K_m), изчислени за хидролизната реакция, са от един и същ порядък когато в реакцията участва ензима от *E.coli* и варират в рамките на един порядък с участието на ацилазата от *A. faecalis*. Стойностите на скоростната константа за хидролизната реакция са по-високи за ацилазата от *A. faecalis* в сравнение с тази от *E.coli*., но и за двата ензима ацилирането е скорост-определящият етап от хидролизата. Профилът на Хаметовите зависимости на $\lg(k_{cat,R}/k_{cat,H})$ от σ_p^- константите на заместителите също е различен: трифазен за ензима от *E.coli* (Фигура 18) и двуфазен за този от *A. faecalis* (Фигура 24). Интерпретацията на тези резултати показва, че нуклеофил-свързващите подцентрове на двата ензима се различават по форма и по химичен характер и катализираната от ацилазата от *E.coli* реакция е значително по-чувствителна към електронните ефекти на заместителите в анилидната част на субстрата. Установено е също така, че заместителите могат да променят пътя и скорост-определящите етапи на реакцията. Интерпретацията на кинетичните резултати за пеницилин G ацилаза от *E.coli* насочва към използването на квантово-механичен модел, в който за пръв път са включени аминокиселинните остатъци AsnB241, AlaB69 и GlnB23. Теоретично изчислените междуатомни разстояния в междинните състояния на моделираната хидролиза на ацетанилид и *p*-нитроацетанилид, катализирана от пеницилин G ацилаза, са показани в Таблица 7 и Фигура 20. Оптимизирани модели на тетраедричния преходен комплекс и второто преходно състояние с участието на различни субстрати, с обозначени разстояния между атоми и групи на активния SerB1 и споменатите по-горе аминокиселинни остатъци (AsnB241, AlaB69 и GlnB23), са представени на Фигури 21 и 22. Интерпретацията на данните, включени в Хаметовата зависимост и квантово-механичното моделиране позволяват да се определят ролята и значението за реакционния механизъм на мрежата от взаимодействия между каталитичния SerB1 и трите аминокиселинни остатъци. Разделите, в които са изложени и дискутирани експерименталните резултати за двата ензима завършват с обобщения, които подчертават значението на проведените кинетични експерименти и на квантово-механичното моделиране за охарактеризиране на каталитичния механизъм на бактериалните пеницилин G ацилази.

Изводите отразяват научните постижения в дисертационния труд и акцентират върху важни за катализа взаимодействия на AsnB241, AlaB69, и GlnB23 с каталитичния серинов остатък и със субстрата в преходните състояния. Последният извод отразява

разликите в каталитичните механизми на пеницилин G ацилазите от *E.coli* и *A. Faecalis*, установени в дисертационния труд. Не прави добро впечатление обаче фактът, че повтарят до голяма степен обобщенията в края разделите (стр. 67 и стр. 73). Формулирани са по-описателно от общоприетото.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в научни статии във FEBS Journal (2009) том 276 (ИФ 3.1) и в Catalysis Communications (2009) том 11 (ИФ 3.0). Материалът е изложен компетентно и стилът е добър, точен и ясен. Критичните бележки към дисертационния труд засягат предимно някои механични пропуски и неточности в израза. Например: на стр.5, стр.20 и стр.24 са дадени номерата на аминокиселинните остатъци (напр. В73, В75 и т.н.) но не са упоменати кои са те. Легендите на някои фигури са непълни (Фиг. 1) или неточни. Например във Фиг. 9, „Кристална структура...” трябва да се замени с „Модел на пространственото разположение (конформацията) на аминокиселинни остатъци от активния център...”, във Фиг.11, 13, 20, 21, 22 – „Структура...”, да се замени с „Модел...”, надписът на Фиг. 17 не е точен. На стр. 22, стр.26 и стр.31 са употребени „stack” и “stacked” конформации, добре е да бъдат използвани еквивалентни понятия на български език. На стр.39 литературният източник е показан като номер, в средни скоби, а номерá в списъка на цитираните автори липсват. На стр.49 „моларни абсорбируемости” трябва да се замени с „моларни абсорбции”. Стр.52, разделът „Резултати и дискусия” започва с подзаглавието: „**1. Хидролиза на ариламиди...**” и следва обобщение резултатите от раздела. Такова обобщение е по-подходящо за края на раздела. Брьонстедовите зависимости (стр.53 и стр.68) не са коментирани и не става ясно защо са показани на Фиг.19 и 25, съответно. Под влиянието на английския израз „backbone chain” в текста се среща съчетанието „скелетна група” (стр.65 и стр.67), което успешно би могло да се замести с „група от основната полипептидна верига”. Отново под влияние на английския, на стр.72 и стр.73 е употребен израза „концертен механизъм” и „концертно протониране” вместо българските: „синхронен механизъм” и „едновременно протониране на напускащата група, разкъсване на amidната връзка и възстановяване на карбонилната група”, например. На стр.76 липсват авторите и заглавието на постерния доклад, който представя резултати от дисертационния труд на Националната конференция по химия през 2004 г.

Тези критични бележки не понижават стойността на извършените изследвания, които компетентно и професионално са изложени в настоящия труд, а имат за цел да помогнат на дисертанта да прецизира израза и изложението на материала.

Научните приноси в дисертационния труд са оригинални и имат научна и научно-приложна стойност. В допълнение към новите кинетични параметри и квантово механичното моделиране на взаимодействия от активния център, които позволяват по-пълно и задълбочено разбиране и охарактеризиране на каталитичния механизъм на две бактериални пеницилин G ацилази, резултатите биха позволили моделиране и „управление“ на субстратната специфичност на ензима, което пък от своя страна би разширило областите на практическите му приложения като катализатор във фармацевтични и лабораторни синтетични реакции.

Личното ми впечатление от автора на дисертацията е отлично. Сигурна съм, че всички, изложени в труда кинетични и квантово-механични резултати са лично дело Д. Жирякова, чийто потенциал, компетентност, и мотивация за задълбочена научно-изследователска работа проличаха от презентацията и обсъждането на материала по време на разкриването на процедурата за защита на дисертационния труд, както и в последващите разговори с дисертантката.

Заключение: Въз основа на анализа на научните приноси и посочените в рецензията на дисертационния труд лични и професионални достойнства, считам, че Диана Александрова Жирякова напълно заслужава да ѝ бъде присъдена образователната и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“, шифър: 01.05.10 и препоръчвам на членовете на Научния съвет при ИОХЦФ да подкрепят това решение.

18.01.2012 г.

Рецензент:

(проф. Райна Ботева, дхн)