

## РЕЦЕНЗИЯ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор” по научната специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично-активни вещества ”, шифър 01.05.10. Тема на дисертационния труд: *”Ензим - субстратни взаимодействия в активния център на пеницилин G ацилаза. Кинетика и молекулно моделиране”*

**Автор на дисертационния труд:** *Диана Александрова Жирякова*

**Рецензент:** *Иванка Борисова Стойнева, доцент, д-р*, Институт по Органична химия с Център по фитохимия – БАН,

Дисертационният труд на редовен докторант Диана Жирякова е разработен в Институт по Органична химия с Център по фитохимия – БАН, в лаборатория „Химия и биофизика на ензими и протеини” под ръководството на доцент Николина Стамболиева. Дисертацията съдържа 91 печатни страници, 4 схеми, 26 фигури, 8 таблици и 87 цитирани литературни източника. Много добро впечатление прави задълбочения литературен обзор с подробна информация за биологичната роля на пеницилин ацилазите, техния биосинтез и каталитична роля. Написан е ясно и логично и личи, че дисертантката владее много добре литературата по материята на бъдещите ѝ изследвания. Целите и конкретните задачи за изпълнение в дисертацията са формулирани ясно и точно. Експерименталната част, резултатите и дискусията са написани информативно, стегнато и компетентно.

### АКТУАЛНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Дисертацията на Диана Жирякова е едно съвременно и комплексно изследване в областта на биоорганичната химия и в частност на биокатализа и е естествено продължение на изследвания на нейният научен ръководител доцент Николина Стамболиева.

Използването на биокатализатори за получаването на семисинтетични аналози на биологично-активни съединения за пръв път е приложено при синтеза на антибиотици, но и днес е особено актуално при синтезния дизайн на нови лекарства. Обект на изследванията в дисертацията на Жирякова е ензимът пеницилин G ацилаза, който намира много разнообразно приложение. Той се използва в производството на  $\beta$ -лактамни антибиотици (полусинтетичните пеницилини и цефалоспорини), в пептидният синтез за въвеждане или деблокиране на фенилацетилна група, във финия органичен синтез за ацилиране на различни органични съединения, и за разделяне на рацемични смеси. Интересът към пеницилин G-ацилазата се определя и от принадлежността ѝ към суперфамилията на Ntn-хидролазите (N-краен нуклеофил), които са обект на интензивни

изследвания в последните години от много учени и имат важно значение при много биологични процеси.

## **МЕТОДИ И ПОДХОДИ**

При изработването на този дисертационен труд е използван широк спектър от изследователски подходи - експериментални и теоретични методи.

Целевите моделни субстрати (12 броя) на пеницилин G ацилазата – фенилацетанилиди с вариращи заместители в напускащата група, обект на дисертацията са синтезирани по познати от литературата методики, сравнително лесни за изпълнение и в тази част няма претенции за оригиналност. За получаването на достоверни кинетични резултати много е важна чистотата на използваните субстрати. Чистотата на всички синтезирани съединения дисертантката е доказала с определяне на точка на топене, елементарен и ЯМР анализи.

За определяне на кинетичните параметри е използвано спектрофотометрично регистриране на хидролизните продукти, като се прилага уравнението на Михаелис-Ментен при стационарни условия. Ензимно-катализираната реакция е проведена във водно-органична среда при стайна температура. Експерименталните резултати са обработени с помощта на програмата SigmaPlot 9.0 чрез регресионен анализ.

За построяване на теоретичния модел на активния център е използван програмен пакет DSViewer. Структурата на ензим-инхибиторния комплекс (кристалната структура на пеницилин G ацилазата с необратимия инхибитор фенолметансулфонил флуорид е взета от базата данни на Protein Data Bank) е оптимизирана чрез молекулна механика със силово поле на Драйддинг с помощта на DSViewer.

За модела на активния център на изследвания ензим са използвани оптимизираните позиции на атомите на каталитично важните аминикиселинни остатъци от В-веригата – SerB1, AlaB69, AsnB241, GlnB23 и на тетраедричния интермедиат, като за простота в него фенилацетилният фрагмент е заменен с ацилен. Оптимизацията на получения модел е направена с квантово-химични изчисления на ниво AM1 с помощта на Gaussian 98.

## **ДОСТОВЕРНОСТ НА РЕЗУЛТАТИТЕ**

В дисертационния труд са получени и се дискутират главно три вида резултати.

Първата група са свързани със синтеза на целеви моделни субстрати на пеницилин G-ацилазата – фенилацетанилиди с вариращи в широк интервал на Хаметовите константи ( $\sigma_p$ ) от -0.26 до 1.27 електронодонорни и електроноекцепторни р-заместители в напускащата група.

Втората група резултати са свързани с детайлен кинетичен анализ на хидролизната реакция и определяне на важните междинни интермедиати и преходни състояния. Построяване на Хаметовите зависимости и анализ на получените резултати. Проведен е и сравнителен анализ на кинетичните параметри на 2 бактериални пеницилин G ацилази от *E.coli* и *Alcaligenes faecalis*.

Третата група резултати са свързани с провеждане на теоретични изследвания за моделиране на активния център и отчитане на важните взаимодействия между аминокиселинните остатъци, отговорни за ефективен катализ на пеницилин G ацилаза от *E.coli*

Имам лични впечатления от работата на Диана Жирякова, която е много прецизна и проявява висока критичност при интерпретиране на получените резултати и достоверността на всички публикувани данни не буди никакви съмнения .

## ОСНОВНИ НАУЧНИ ПРИНОСИ

Дисертационният труд има следните научни приноси:

Проведени са сравнителни кинетични изследвания с голяма серия моделни субстрати – фенилацетил *p*-заместени анилиди, за два хомоложни ензима – пеницилин G ацилаза от *E. coli* и от *Alcaligenes faecalis* - малко изучен ензим до сега. Установено е, че нуклеофил свързващите под центрове на двата ензима се различават не само по форма, но и по химичен характер.

**За пръв път е установен трифазен профил на Хаметовите зависимости** на  $\lg(k_{cat,R}/k_{cat,H})$  от  $\sigma_p^-$  константите на заместителите при анилидни субстрати за пеницилин G ацилазата от *E. Coli*, докато при пеницилин G ацилаза от *Alcaligenes faecalis* се наблюдава двуфазен профил.

Предложен е усложнен теоретичен модел на активния център на пеницилин G ацилазата от *E. coli*, в който са включени и спомагателни аминокиселинни остатъци, не участващи пряко в каталитичната реакция. Оптимизирани са структурите на изходното състояние, интермедиата и крайното състояние, както и на преходните състояния за двете междинни стъпки от етапа на ацилиране на Ес-PGA-катализираната хидролиза за няколко моделни субстрата – *N* - (4-метоксифенил) - ацетамид, ацетамид, *N* - (4-нитрофенил) - ацетамид, *N*-фенилацетамид.

Идентифицирана е скорост определящата стъпка от етапа на ацилиране на катализираната от Ес-PGA хидролиза на анилиди с вариращ заместител в напускащата група.

Изказана е хипотеза за приноса в катализа на някои вътрешно-молекулни взаимодействия между функционални групи от спомагателните аминокиселинни остатъци и каталитичния център. **За първи път е показано участието на протонираната  $\alpha$ -аминогрупа на SerB1 в стабилизирането на оксианиона в тетраедричния интермедиат, както и спомагателната роля на аминокиселинния остатък GlnB23 в каталитичната реакция.**

Направените научни изводи отразяват коректно получените резултати за не описани досега в литературата данни за важни за катализа взаимодействия на аминокиселинни остатъци от В веригата AsnB241, AlaB69 и GlnB23 с каталитичния SerB1 в активния център на пеницилин G ацилази .

**Основните приноси в дисертацията на Диана Жирякова имат оригинално научно и приложно значение и се определят като обогатяване с нови данни на съществуващите знания в областта биокатализа.**

### **КРИТИЧНИ БЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ**

Повечето от направените критични бележки при предварителното обсъждане на дисертационния труд са взети под внимание, но има и някои пропуски. Свидетел съм на стремежа към перфекционизъм на Д. Жирякова и затова е странно, че на стр.55 всяка от 3-те фигури има собствен размер. На стр. 16, 57 , 67 надписите на схемите са поставени отгоре. В първата половина на дисертационния труд надписите на фигурите са правилно поставени, докато във втората половина са отгоре. Не са номерирани литературните източници и това малко затруднява проследяването им. Срещат се и някои неточности в изказа, като на стр. 68 „белтъчно обкръжение” вместо „от аминокиселинни остатъци” или на стр. 71”пасва” . На места в текста са изписани директно на английски координатите на фигури (23, 26), или се ползва директно преведен израз като „концертен механизъм” вместо синхронен и др. подобни .

Имам следния въпрос към дисертантката:

Как вижда получените от нея резултати да намерят приложение в практиката.

### **ЛИЧЕН ПРИНОС НА ДИСЕРТАНТА**

Не буди никакво съмнение, че експерименталната синтетична и теоретичната работа, както и кинетичните изследвания и интерпретацията на резултатите в дисертацията са лично дело на дисертантката, извършено под ръководството на нейния научен ръководител.

Личният принос на Диана Жирякова е неоспорим от съавторите и при подреждането на авторите в публикациите по дисертацията. Резултатите са публикувани в престижните списания FEBS Journal и Catalalysis Communications . По материалите от дисертационния труд е забелязан 1 цитат от 2011 година.

Авторефератът е изготвени съгласно изискванията и отразява основните научни резултати, описани в дисертацията.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертационната работа на Диана Жирякова е едно съвременно и комплексно изследване в областта на биокатализа. Кандидатката за получаване на образователната и научна степен “Доктор” е овладяла методите за синтез на специфични субстрати в разтвор, тяхното пречистване и охарактеризиране. От представеният експериментален материал и от получените резултати, се вижда, че дисертантката е придобила много нови познания, усвоила е нови експериментални техники и теоретични подходи и умело интерпретира сложните кинетични и теоретични резултати. Получените научни резултати са публикувани в 2 специализирани научни списания с висок импакт фактор. По време на изработването на дисертацията си Диана Жирякова се показва като един изключително трудолюбив, прецизен, знаещ и можещ млад учен. Поради това убедено препоръчвам на членовете на научното жури да гласуват за присъждането на редовен докторант Диана Жирякова образователната и научна степен “Доктор”.

09.01 2012 г

/доцент д-р Ив.Стойнева/