

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию **Петренко Дмитрия Евгеньевича** «Изучение бактериальной олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* с применением рентгеновских методов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология

Изучение взаимосвязи структуры и функции белков, включая структурные основы субстратной специфичности и каталитической эффективности ферментов, является одной из фундаментальных задач энзимологии и структурной биологии. Недооценка ключевой роли отдельных структурных детерминант в тонкой регулировке селективности и эффективности катализа сдерживает развитие рациональных подходов к созданию промышленно важных биокатализаторов методами белковой инженерии, что определяет актуальность этой проблемы для биотехнологии. Детальный анализ пространственной структуры субстрат-связывающего центра и понимание механизма катализа, реализуемого в ферменте, необходимы не только для создания новых биокатализаторов с заданной субстратной специфичностью, но и для моделирования высокоспецифичных фармакологических ингибиторов, способных подавлять нежелательную ферментативную активность, ассоциированную с теми или иными патологическими процессами. Такие ингибиторы становятся действующей основой лекарственных средств, в том числе, антибактериальных препаратов, если они подавляют метаболический путь характерный для бактериальной клетки.

Изучение взаимосвязи структуры и функции требует проведения комплексных структурно-функциональных исследований, в рамках которых изучают пространственные структуры ферментов, как в свободной форме, так и в составе различных комплексов. Для подтверждения ключевой роли выявленных аминокислотных остатков проводят биоинформатический анализ, сравнительный структурный анализ и исследования мутантных форм фермента. Диссертационная работа Дмитрия Евгеньевича Петренко описывает решение вышеперечисленных задач.

Объектом исследования диссертационной работы была бактериальная олигопептидаза В (OpV). OpV - это трипсиноподобные сериновые пептидазы, относящиеся к семейству пролилолигопептидаз (POP). OpV обнаружены у бактерий, в клетках протозойных паразитов (трипаносом и лейшманий) и некоторых растений. Данные ферменты отсутствуют у млекопитающих, в частности, человека. Известно, что OpV являются факторами патогенеза при паразитарных инфекциях. В острых фазах заболевания эти ферменты попадают в кровь больных, где гидролизуют ряд физиологически-важных пептидов, включая предсердный натрийуретический фактор, что вызывает нарушения в системе кроветворения. Патогенная роль бактериальных OpV изучены гораздо

хуже, однако было показано, что эти ферменты обеспечивают резистентность бактерий к антимикробным пептидам, обогащёнными основными аминокислотными остатками. Следует отметить, что несмотря на большое количество работ, посвящённых функциональным исследованиям бактериальных ОрВ, пространственные структуры были получены только для протозойных ферментов. Представленная диссертационная работа как раз и посвящена заполнению этого пробела.

Научная новизна исследования заключается в том, что автором впервые были получены и подробно проанализированы пространственные структуры бактериальной ОрВ из *S. Protamaculans* (PSP). В работе представлено восемь пространственных структур, включая структуры свободного белка дикого типа и мутантных форм, а также комплексов с ингибиторами. Сравнительный анализ полученных структур показал, что способ стабилизации каталитической триады PSP в активном состоянии отличается от ранее описанного для ферментов простейших. Помимо рентгеноструктурного анализа, автором был использован ещё один рентгеновский метод (метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР)). Сравнение структурных данных, полученных от белка в кристаллическом состоянии и в растворе, позволило расширить представления о конформационном разнообразии ОрВ.

Для выполнения поставленных задач Петренко Д.Е. провёл широкий спектр экспериментальных и вычислительных работ, включая мутагенез, получение, очистку и характеризацию рекомбинантных белков, подбор условий кристаллизации, решение и уточнение пространственных структур, МУРР и биоинформатический анализ. На основании полученных экспериментальных данных диссертантом были сделаны обоснованные выводы, достоверность которых не вызывает сомнений. Полученные результаты могут послужить отправной точкой для моделирования каталитического цикла бактериальных ОрВ методами молекулярной динамики, а также для поиска специфических ингибиторов, перспективных для разработки новых антибактериальных препаратов.

Диссертационная работа Д.Е. Петренко с точки зрения оформления и подачи материала соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Представленная работа изложена на 116 страницах и включает в себя список использованных сокращений, введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждения, выводы и список использованных литературных источников. Работа включает 36 рисунков и 14 таблиц, что представляет хороший иллюстративный материал и облегчает восприятие текста.

Во введении автор аргументирует актуальность темы, формулирует цели и задачи своей работы, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов. В обзоре литературы, написанном на основании 194-х источников, изложены основные сведения о функциональных и структурных особенностях представителей семейства пролилолигопептидаз. Отдельный раздел посвящён изучению патологических свойств пролилолигопептидаз, в частности, олигопептидаз В. Кроме того, приводится

подробный анализ работ, посвященных структурным исследованиям протозойных олигопептидаз В.

В следующей главе подробно описываются использованные в диссертационной работе материалы и методы. Автор демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и структурной биологии. В целом, работа выполнена на очень высоком экспериментальном уровне, что, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Глава «Результаты и обсуждения» состоит из двух разделов и содержит основные результаты работы. В первом разделе представлен подбор условий кристаллизации ферментов, а также определение физико-химических свойств и каталитической активности мутантных белков. Далее идёт описание и сравнительный анализ полученных пространственных структур свободных ферментов, которые были закристаллизованы в промежуточной конформации. Эта конформация, в которой сближение доменов произошло без сборки каталитической триады, мало описана в литературе. Затем автор приводит сравнительный анализ пространственных структур фермента в комплексе с ингибитором. Одна из таких структур представляла фермент в закрытой, каталитически-активной конформации. В этом случае одна молекула ингибитора связалась с двумя каталитическими остатками фермента дикого типа с образованием переходного тетраэдрического комплекса. Вторая структура была получена для мутантного фермента со сниженной каталитической активностью. В этом случае две молекулы ингибитора независимо связались с двумя остатками каталитической триады, препятствуя её сборке. Далее автор описывает анализ конформационного состояния фермента в растворе и показывает, что в данном случае преобладающей является открытая конформация фермента, причём, мутации (или добавление спермина) приводят к появлению (или накоплению) промежуточной конформации. Затем автор сопоставляет полученную пространственную структуру PSP в закрытой конформации с аналогичной структурой протозойной OrB и находит разницу в способе стабилизации каталитической триады у бактериального и протозойного фермента.

Следующий раздел посвящен биоинформатическому исследованию представленности нового способа стабилизации каталитической триады, найденного в PSP, среди бактериальных OrB. Показано, что в отличие от протозойных OrB, в которых этот способ консервативен для всех представителей, бактериальные ферменты можно разделить на две большие группы. В заключении, для подтверждения вышеизложенного, автором были построены модели нескольких OrB из бактерий - возбудителей внутрибольничных инфекций, принадлежащих к разным группам, и проведён их структурный анализ.

Результаты работы изложены подробно и читаются с большим интересом. Видно, что автором проделан большой объем работы, выполненной на высоком научном уровне, а полученные результаты имеют практическое значение и могут быть использованы в дальнейших исследованиях.

Несмотря на то, что работа в целом выполнена на высоком уровне, имеется ряд замечаний. В тексте встречаются неизбежные при таком объеме текста опечатки и неудачные выражения, в небольшом объеме присутствуют англицизмы. Имеется также уточняющий вопрос к диссертанту. В работе обсуждается способ стабилизации каталитической триады в активной конформации у протозойных и бактериальных ферментов. А что можно сказать о модели взаимодействия OpV с субстратами это конформационный отбор или индуцированная подгонка?

Однако высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

На основании вышеизложенного следует сделать заключение, что диссертационная работа Петренко Дмитрия Евгеньевича соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Заведующий лабораторией  
биологически активных наноструктур  
Отдела генетики и молекулярной  
биологии бактерий  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
"Национальный исследовательский  
центр эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика  
Н.Ф.Гамалеи" Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
д.б.н.

Лунин Владимир Глебович

Адрес места работы: 123098, г.Москва, ул.Гамалеи, д. 18.  
Тел.: +7 (499) 193-30-01, E-mail: info@gamaleya.org

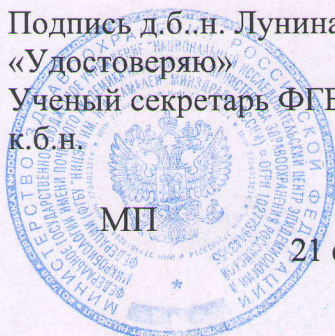
Подпись д.б.н. Лунина В.Г.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

к.б.н.

Сысолятина Елена Владимировна



МП

21 февраля 2024 г.