

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

Создание эффективных лекарственных средств и вакцин против болезней паразитарной природы невозможно без понимания патогенеза этих болезней и механизмов взаимодействия паразит-хозяин. Изучение пептидаз бактерий и паразитических простейших, ответственных за деградацию регуляторных пептидов организма-хозяина в физиологических условиях, дает ключ к разгадке механизмов вирулентности, который может быть использован для предотвращения развития этих болезней. Понимание каталитического цикла олигопептидаз В (OpV) может указать путь к получению специфических лекарственных средств против заболеваний, которые поражают как домашних животных, так и миллионы людей во всем мире. Специфические ингибиторы OpV при использовании в качестве терапевтических средств могут обладать низкой токсичностью ввиду отсутствия этого фермента у млекопитающих. Однако, создание таких ингибиторов осложняется отсутствием необходимых структурных данных.

Ранее были получены пространственные структуры OpV из *Leishmania major* (LmOpV) и *Trypanosoma brucei* (TbOpV), последняя была закристиаллизована в виде свободного фермента в открытой (каталитически не активной) форме и в комплексе с ингибитором – в закрытой (каталитически-активной) форме. Их анализ позволил предложить механизм сборки каталитического центра при движении доменов и выявить структурные детерминанты, необходимые для реализации этого механизма. Закрытая конформация стабилизируется сетью междоменных контактов, а активная конфигурация каталитической триады обеспечивается междоменным солевым мостом SM1. Однако, прямой перенос каталитического механизма, предложенного для протозойных ферментов, на бактериальные OpV оказался невозможен, т.к. многие аминокислотные последовательности бактериальных OpV отличаются от последовательностей ферментов простейших в тех позициях, которые являются структурными детерминантами, необходимыми для реализации механизма каталитической активации.

Таким образом, изучение структурных особенностей бактериальных олигопептидаз В являлось актуальной задачей, решение которой было необходимо для уточнения механизма каталитической активации этих ферментов и могло способствовать успешной разработке новых терапевтических препаратов.

Диссертация Петренко Д.Е. изложена на 116 страницах, написана по традиционному плану и состоит из списка используемых сокращений, введения,

обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 242 наименования. Материалы работы неоднократно были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях и научных школах. По теме работы опубликовано восемь статей в зарубежных и российских научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций.

Представленный во введении материал способствует четкому позиционированию цели и обоснованию актуальности работы. Для достижения указанной цели автором формулируются пять основных задач.

Глава «Обзор литературы» состоит из четырех частей. В первой, вводной части описываются общие характеристики семейства пролилолигопептидаз, а также и их сходства и различия с хорошо исследованными классическими сериновыми протеазами. Вторая часть посвящена подробному описанию представителей данного семейства, в том числе приведены данные по структурным исследованиям и конформационному разнообразию этих ферментов. В третьей части описывается функциональная важность пролилолигопептидаз, при этом особое внимание уделено описанию патогенной роли ОрВ. Последняя часть посвящена изучению структурно-функциональных особенностей ОрВ, в том числе описываются проведенные ранее работы с объектом исследования данной диссертационной работы - ОрВ из *Serratia proteamaculans* (PSP).

Глава «Материалы и методы» содержит описание материалов, которые были использованы в данной диссертационной работе, а также детальную информацию об используемых методах. Следует отметить, что в работе применяется широкий набор методических подходов, что позволило автору проанализировать разные аспекты изучаемых явлений и решить все поставленные задачи.

Глава «Результаты и обсуждения» является основным разделом диссертации и состоит из двух частей. Первая часть посвящена структурному анализу объекта исследования – PSP, ряда её мутантных форм и комплексов с необратимыми ингибиторами. Кроме того, она содержит сравнительный анализ каталитической активности и физико-химических свойств полученных мутантных белков. Получение пространственных структур бактериальной ОрВ осложнялось плохой кристаллизруемостью данного белка. В работе были установлены условия, стабилизирующие фермент и способствующие кристаллизации, в частности показано положительное влияние на кристаллизацию модификации шарнирного региона, соединяющего два домена фермента, а также присутствия молекул спермина в кристаллизационном растворе. В результате, методом рентгеноструктурного анализа были получены пространственные структуры бактериальной ОрВ в двух конформациях: закрытой и промежуточной. Последняя, в которой сближение доменов произошло без формирования активной конфигурации каталитической триады, ранее не была описана для ОрВ. Параллельно, с использованием ещё одного рентгеновского метода (малоуглового рентгеновского рассеяния) было показано,

что в растворе PSP имеет преимущественно открытую конформацию с незначительными примесями фермента в промежуточной конформации, а при добавлении спермина происходит накопление промежуточной конформации. Пространственные структуры комплекса PSP или его модифицированного варианта с необратимым ингибитором продемонстрировали два типа связывания ингибитора. Классический способ связывания позволил получить пространственную структуру фермента в закрытой (каталитически-активной) конформации и описать тетраэдрическое переходное состояние. На основании сравнения пространственных структур PSP и TbOpV в закрытых конформациях были выявлены 2 способа стабилизации активного центра фермента в каталитически-активной конформации.

Вторая часть посвящена поиску и сравнительному анализу аминокислотных последовательностей бактериальных OpV, проведённому с целью выявления способа стабилизации каталитической триады по бактериальному (PSP-подобному) или протозойному (TbOpV-подобному) типу. Данный биоинформатический анализ показал, что все бактериальные ферменты чётко разделяются на две большие группы: TbOpV- и PSP-подобные.

Таким образом, на основании анализа диссертационной работы можно констатировать, что цели работы, сформулированные автором, достигнуты, а поставленные задачи выполнены. При этом Д.Е. Петренко проявил себя как высококвалифицированный специалист, владеющий широким арсеналом современных методов исследований. Полученные автором данные являются достоверными, а сделанные выводы – логичными и обоснованными.

Несмотря на несомненные достоинства работы, ниже приводятся некоторые замечания, касающиеся ее оформления, а также некоторые замечания, касающиеся выполненной работы.

Замечания по оформлению диссертационной работы.

1) Структура диссертации:

- а) Пункты 1.3.1, 1.4.1 главы «Обзор литературы» содержат подзаголовки, которые не отображены в оглавлении.
- б) Глава «Материалы и методы» не разделена на отдельные пункты, в связи с этим сложно целиком сразу оценить выбор методов, использованных в работе.
- в) Первый абзац пункта 3.1.8. полностью посвящён описанию и применению метода МУРР и должен быть перенесён из главы «Результаты и обсуждения» в главу «Материалы и методы».

2) Недочёты оформления текста:

- а) Одинокая красная точка на странице 56, серые скобка с точкой на странице 92, серый фон для названия пункта 3.2 (в том числе в оглавлении).
- б) Нет единообразия в оформлении сокращений: используются преимущественно английские, но также есть и русские сокращения. Буквы русского и латинского алфавитов имеют одинаковое начертание, так что отсутствие единообразия существенно усложняют чтение материала. В том числе каталитические аминокислотные остатки

сокращены до однобуквенного обозначения. Например: «каталитического Н» – правильное было бы писать название аминокислоты целиком, чтобы не приходилось догадываться гистидин это, водород, русская буква «Эн» или что-нибудь ещё.

в) Также использована разная логика сокращений для олигопептидаз из разных организмов: LmOpB - олигопептидаза B из *L. major*, TbOpB - олигопептидаза B из *T. brucei*, а олигопептидаза B из *S. proteamaculans* почему-то PSP.

г) Отсутствие согласования падежей. Например, раздел «Выводы» (предпоследний пункт): «Структура PSP в комплексе с ингибитором позволила охарактеризовать закрытую (каталитически-активную) конформация фермента и описать тетраэдрическое переходное состояние».

д) Кое-где встречается «калька» перевода с английского. Например: третье предложение введения «...во внутреннюю полость интерфейса между доменами, где находится каталитическая триада».

е) На странице 16 перепутана ссылка: «Кинетические исследования этого фермента показали, что лимитирующей стадией катализа являются конформационные изменения, а не химическая стадия, что характерно для классических сериновых протеаз трипсинового типа [17]». Полагаю, имеется в виду ссылка 14.

Замечания по выполненной работе.

- 1) В пункте 3.1.2 (страница 64) написано: «положения максимумов кривых плавления (T_{max}) PSPmod и PSP отличаются незначительно (на 2 °C)» – однако, как описано в п. 3.1.1., именно такая разница (2 °C) позволила вам стабилизировать белки в растворе и получить кристаллы.
- 2) В пункте 3.1.2 (страница 64): «При этом такие характеристики субстратной специфичности PSP, как повышенная активность по отношению к двухосновным субстратам или предпочтение остатка Arg перед Lys в положении P2, сохраняются.» - несколько неудачно составлено предложение. Не понятна какие кинетические параметры сравниваются. В таблице 9 ошибка в название субстрата (написано Z-KP-pNA, скорее всего имеется ввиду Z-KR-pNA). Формулы субстратов, к сожалению, в диссертации не представлены.
- 3) Страница 81. Подпись к рисунку 24 (б, в) не содержит значений уровня срезки электронной плотности (map level). Данные для структуры 7NE7, депонированные в PDB Bank, вызывают сомнение в интерпретации связывания метиленовой группы ТСК с кислородом боковой группы серина 532 (рисунок 24В, левая структура). С химической точки зрения представляется возможным образование двух первых структур, но механизм образования третьей вызывает вопрос. В ингибиторе ТСК активированным остатком является концевой хлорацетонный фрагмент. Известно из синтетических статей, что хлорацетон реагирует с нуклеофилами в первую очередь активированной карбонильной группой, а не концевым хлором. Механизм ковалентного связывания,

таким образом, на первой стадии в каталитическом остатке подразумевает атаку либо ОН-группой серина, либо азотом имидазольного цикла гистидина на карбонил ТСК. Так как промежуточный полуаминаль у гистидина более нестабилен и может обратимо распасться на исходные составляющие, то по карбонилу ковалентно присоединиться может лишь серин, образуя полуацеталь. На следующей стадии становится возможным заместить хлорид в ТСК на азот имидазола и образовать ковалентно связанную структуру по двум аминокислотам (рисунок 24Б). Из данного дизамещенного аддукта полуацеталь достаточно легко может разложиться с образованием структуры с одним гистидином (рисунок 24В, правая структура). Образование же структуры «наоборот», с серином с конца ТСК вместо хлора, вызывает вопрос по механизму. Если диссертант уверен в интерпретации электронной плотности, пожалуйста, поясните гипотетический механизм образования такой структуры.

Однако перечисленные выше замечания ничуть не умаляют актуальность, новизну и научную значимость представленной диссертационной работы.

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.

Старший научный сотрудник
Лаборатории химических основ биокатализа
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии
имени В. А. Энгельгардта Российской
академии наук
к.х.н.

Морозова Елена Андреевна

Адрес места работы: 119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 32.
Тел. 8(499)135-23-11, e-mail: isinfo@eimb.ru

Подпись к.х.н. Морозовой Е.А. удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН
к.в.н.

Бочаров Александр Анатольевич

МП

16 февраля 2024 г.

