

Министерство науки и высшего образования  
Российской Федерации

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский физико-технический институт  
(национальный исследовательский университет)»  
(МФТИ, Физтех)

Юридический адрес: 117303, г. Москва,  
ул. Керченская, дом 1А, корпус 1  
Почтовый адрес: 141700, Московская обл.,  
г. Долгопрудный, Институтский переулок, дом 9  
Тел.: +7 (495) 408-42-54, факс: +7 (495) 408-68-69  
info@mipt.ru

22.02.2024 № 26-05/1439

на №

от

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе



Баган Виталий  
Анатольевич

2024 г.

## ОТЗЫВ

Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» 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

### Актуальность диссертационной работы

Диссертационная работа Петренко Дмитрия Евгеньевича посвящена изучению олигопептидаз В (OpВ) с использованием рентгеновских методов исследования. Олигопептидазы В представляют собой сериновые пептидазы, обладающие трипсиноподобной субстратной специфичностью, найденные в бактериях, паразитических простейших и некоторых растениях. OpВ относятся к подсемейству S9A семейства пролилолигопептидаз (POP). OpВ являются известными факторами патогенеза тяжёлых паразитарных заболеваний и некоторых бактериальных инфекций, данные пептидазы также участвуют в защите бактерий от антимикробных пептидов. Кроме того, OpВ отсутствуют у млекопитающих. Таким образом, актуальность диссертационной работы Петренко Дмитрия Евгеньевича обусловлена перспективностью использования OpВ в качестве мишеней при разработке противопаразитарных и антибактериальных препаратов.

Моделирование низкомолекулярных ингибиторов требует наличия пространственных структур ферментов-мишеней, находящихся в каталитически-активных конформациях, и знания механизмов каталитической активации. Такие данные были получены для ферментов простейших, а также для бактериальных пролилэндопептидаз (PEP), относящихся к тому же подсемейству S9A, что и OpV. Однако, механизм каталитической активации, предложенный для OpV простейших и бактериальных PEP, не мог быть автоматически перенесён на OpV бактерий, так как в последних необходимые для реализации данного механизма аминокислотные остатки интерфейса между доменами не были консервативными.

#### **Научная новизна исследования**

Автором впервые были получены и охарактеризованы пространственные структуры бактериальной OpV из *Serratia proteamaculans* (PSP) дикого типа и её мутантных производных, включая каталитически неактивные мутанты, несущие аланиновые замены каталитического серина, и ферменты с измененной аминокислотной последовательностью шарнирного пептида (PSPmod), соединяющего пропеллерный и каталитический домены. Кроме того, получены структуры комплексов PSP и PSPmod с необратимым ковалентным ингибитором N $\alpha$ -p-тозил-лизилхлорметилкетон (ТСК). В семи случаях PSP и её производные были закристаллизованы в промежуточной конформации, не описанной для протозойных OpV, комплекс PSP-ТСК представлял закрытую (каталитически-активную) конформацию фермента.

В результате проведения диссертационной работы было установлено, что модификация шарнирного региона и присутствие спермина в кристаллизационном растворе способствует кристаллизации фермента. При этом модификация шарнирного региона снижала каталитическую активность PSP, а также влияла на способ связывания фермента с ингибитором.

Методом МУРР показано, что в растворе PSP существует преимущественно в открытой (каталитически не активной), конформации, а при добавлении спермина фермент переходит в промежуточную конформацию.

Сравнительный структурный анализ закрытых конформаций PSP и протозойных OpV выявил существенные различия в способе стабилизации собранной каталитической триады, на основе которого все бактериальные OpV были разделены на две группы.

#### **Научно-практическая значимость работы**

Полученные пространственные структуры PSP в промежуточной и закрытой конформации могут быть использованы для решения таких задач,

как моделирование каталитического цикла бактериальных OpV, получения мутантных белков с изменённой активностью и субстратной специфичностью, а также для поиска и/или моделирования ингибиторов OpV и POP, способных оказывать терапевтический эффект при протозойных и бактериальных инфекциях. В частности, можно отметить, что влияние модификации шарнирного пептида на каталитическую активность PSP, указывает на возможность использования этого региона в качестве потенциальной мишени при моделировании специфических ингибиторов фермента.

Использованная в работе комбинация экспериментальных (РСА и МУРР) и вычислительных методов структурной биологии может быть использована для исследования конформационной variability белков в растворе и выбора наиболее достоверной модели из структурных вариантов, полученных в результате молекулярного моделирования и молекулярной динамики.

#### **Степень достоверности научных результатов и выводов диссертационной работы**

Достоверность полученных результатов подтверждается восемью публикациями автора в рецензируемых научных журналах. Задачи исследования корректно сформулированы и соответствуют поставленной цели. Результаты экспериментов представлены в виде большого количества рисунков и таблиц. Выводы диссертационной работы вытекают из полученных результатов и полностью соответствуют поставленным задачам. Достоверность результатов и выводов не вызывает сомнений и определяется надёжностью применявшихся методов исследования, повторяемостью значений измеряемых параметров в многочисленных экспериментах.

#### **Структура и содержание работы**

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, состоит из введения, обзора литературы, трех глав, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы.

Во введении автором сформулированы цель и задачи исследования, показана актуальность работы, раскрыты научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе рассматриваются основные исследования по изучаемой проблеме. Автором проведен анализ представителей семейства POP, проанализированы работы по структурным исследованиям POP, включая исследования протозойных OpV и бактериальных пролилэндопептидаз (PEP).

Во второй главе подробно описываются используемые в работе материалы и методы. Описано получение рекомбинантных олигопептидаз и анализ их каталитической активности, проведение мутагенеза, подбор условий кристаллизации, решение и уточнение пространственных структур, а также

эксперименты по моделированию белков и комплексов и эксперименты по молекулярно-динамической симуляции.

В третьей главе автор приводит и анализирует результаты теоретических и экспериментальных исследований PSP. В разделе 3.1 описывается получение и структурные исследования PSP и её мутантных форм и комплексов, а также приводится сравнительный анализ полученных пространственных структур, в частности, сравнение с известными пространственными структурами протозойных OpV. Во втором разделе автор приводит результаты биоинформатического анализа бактериальных OpV, проведённого с целью изучения встречаемости двух способов стабилизации собранной каталитической триады.

Автореферат полностью и точно отражает содержание диссертации.

#### **Замечания и вопросы**

1. В докладе не были представлены характеристики полученных дифракционных данных, а также значения основных параметров, характеризующих качество проведенной автором обработки дифракционных данных.

2. При описании экспериментов по снятию дифракционных данных не были указаны конкретные названия и характеристики используемых экспериментальных установок.

3. Диссертантом не было раскрыто, как проводился выбор стабилизирующих агентов, какова возможная природа стабилизации PSP спермином.

4. Не было обсуждено, каков возможный функциональный смысл имеет промежуточная конформация PSP!

5. На рисунках, демонстрирующих электронную плотность лиганда, не разъяснено, на каком уровне и какого типа карты представлены вокруг лиганда, содержит ли плотность кристаллографический баяс от модели.

Отмеченные замечания не снижают общий высокий уровень диссертационной работы.

#### **Заключение**

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.

Отзыв на диссертацию обсуждён и одобрен на расширенном научном семинаре Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний МФТИ, Физтех «20» февраля 2024 г., протокол № 2.

Кандидат физ.-мат. наук



Борщевский Валентин Иванович

**Почтовый адрес:** 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер.,9

**Телефон:** 8 (964) 632-86-50

**Адрес электронной почты:** borshchevskiy.vi@phystech.edu

**Организация – место работы:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», лаборатория структуры и динамики биомолекул

**Должность:** заведующий лабораторией

**Web-сайт организации:** <https://mipt.ru>

Кандидат физ.-мат. наук



Ремеева Алина Анваровна

**Почтовый адрес:** 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер.,9

**Телефон:** 8 (926) 947-30-43

**Адрес электронной почты:** alina.remeeva@phystech.edu

**Организация – место работы:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», лаборатория структурного анализа и инжиниринга мембранных систем

**Должность:** старший научный сотрудник

**Web-сайт организации:** <https://mipt.ru>