

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание учёной степени кандидата химических наук
Шапошникова Леонида Александровича
на тему: «Клонирование и изучение структурно-функциональных
характеристик рибонуклеозидгидролазы С (RihC) из бактерий
***Limosilactobacillus reuteri* LR1»**
по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология

Внутрибольничные инфекции являются серьёзной угрозой здоровью людей, повышающаяся с каждым годом резистентность к традиционным антибиотикам у микроорганизмов-возбудителей этих инфекций побуждает исследователей искать новые подходы к борьбе с этими патогенами. Одним из перспективных подходов является использование пробиотических штаммов бактерий, а также их ферментов и метаболитов. В данной работе подробно изучается один из ферментов лактобактерий, выделяющийся в ответ на присутствие клебсиелл – рибонуклеозидгидролаза С.

В рамках работы Л.А. Шапошникова получена и детально охарактеризована новая рибонуклеозидгидролаза С (RihC) из *Limosilactobacillus reuteri* и впервые показано, что под действие этого фермента снижается эффективность формирования биоплёнок патогенными бактериями, в том числе клебсиеллами.

Диссертационная работа Л.А. Шапошникова изложена по традиционному плану на 117 страницах, содержит 36 рисунков и 12 таблиц, и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, основной части, содержащей результаты исследования и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 216 ссылок.

Во введении сформулированы актуальность темы диссертации, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

Обзор литературы посвящен описанию *L. reuteri* – пробиотического организма, из которого был выделен фермент, а также анализу структуры и функций рибонуклеозидгидролаз – семейства ферментов, к которому относится исследуемый белок. Содержание обзора литературы хорошо соответствует экспериментальной части работы и, несомненно, важно для ее понимания. Обзор написан подробно и в то же время достаточно кратко, отражает современное состояние исследований и позволяет лучше оценить значимость полученных автором диссертации результатов.

В разделе «Материалы и методы» достаточно подробно описаны использованные в работе экспериментальные подходы. Очевидно, что автор

на высоком уровне владеет использованными при выполнении диссертационной работы современными методами биоинформатики, биохимии, энзимологии, молекулярной биологии и генетической инженерии, а также аналитической химии.

Раздел «Результаты и их обсуждение» является основной главой диссертации и логически может быть разделен на четыре части. Первая часть связана с получением и очисткой рекомбинантного фермента RihC. Автором были сконструированы рекомбинантные продуценты RihC с дополнительными шестью остатками гистидина на N- или C-конце. Изучено накопление каждого из вариантов белка в клетках *E. coli*. Оба белка были очищены с использованием металлохелатной аффинной хроматографии и определена их олигомерная форма в растворе.

Вторая часть посвящена характеристике полученной рибонуклеозидгидролазы С. Для решения этой задачи была разработана оригинальная методика количественного определения активности фермента. Необходимо отметить, что методики для изучения активности ферментов RihC ранее были описаны. Однако в ходе работы был предложен новый подход, основанный на применении гидрофильной хроматографии. Это решение позволило достичь пятикратного сокращения времени анализа, что позволяет рассматривать созданную методику как наиболее эффективный из существующих способов определения активности нуклеозидгидролаз и открывает перспективы для ее широкого применения при исследовании ферментов этой группы. Обсуждаемая методика позволила автору детально охарактеризовать энзиматические свойства RihC, а также исследовать термостабильность фермента.

В третьей части главы автор подробно проанализировал структуру RihC, полученную с помощью рентгеновской кристаллографии, определил ключевые остатки активного центра и их роль в катализе. Также был проведен сравнительный анализ ряда ключевых областей в структуре как уже изученных ферментов, имеющих кристаллические структуры, так и модельных структур некоторых ферментов из группы RihC, что позволило выдвинуть предположения о влиянии этих областей молекулы на каталитические параметры.

Заключительная часть главы посвящена исследованию действия рекомбинантного фермента RihC на патогенные организмы группы ESKAPE. Автором проанализировано антибактериальное действие RihC на представительный набор клинических изолятов, оценена способность

фермента усиливать действие антибиотиков, а также изучено влияние белка на формирование бактериальных биопленок. Было продемонстрировано, что RihC усиливает действие меропенема на *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*, а также снижает эффективность формирования биопленок бактериями *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Несомненно, противобактериальное действие RihC нуждается в дальнейших исследованиях, однако полученные данные впервые указывают на то, что этот фермент может быть вовлечен в межбактериальную конкуренцию.

Работа Л.А. Шапошникова выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением современных методов исследования, что обуславливает надежность полученных экспериментальных данных. Выводы подкреплены подробным описанием проведенных экспериментов. В этом плане достоинства работы несомненны.

Диссертационная работа лишена существенных недостатков, которые могли бы препятствовать ее успешной защите. Тем не менее, в отношении работы можно сделать несколько замечаний.

1. Главным итогом работы Л.А. Шапошникова, на мой взгляд, являются данные о действии рибонуклеозидгидролазы С на бактерии. В то же время информация в соответствующем разделе диссертации представлена не полно. Прежде всего, отсутствует полный список бактериальных штаммов, на которых проводилось тестирование. Приведены только штаммы, при действии на которые были обнаружены те или иные эффекты. Таким образом, из текста диссертации невозможно получить полное представление о специфичности наблюдаемых эффектов, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. Кроме того, автор лишь констатирует факты усиления действия антибиотика меропенема и влияния RihC на формирование биопленок, но не пытается интерпретировать эти факты, выдвинуть на их основе рабочие гипотезы и, таким образом, наметить перспективные направления дальнейших исследований.

2. Одним из ключевых результатов работы, как отмечено выше, является разработка новой методики количественного определения активности нуклеозидгидролаз. Однако представление этого результата в диссертации, на мой взгляд, является не вполне удачным. Прежде всего, из текста диссертации не очевидна структура синтезированной автором стационарной фазы. Кроме того, декларируя преимущества новой методики перед ранее описанными, автор не проводит анализа предложенных решений,

не обсуждает механизмы, которые лежат в основе более высокой эффективности.

3. В тексте диссертации следовало бы более подробно представить ход очистки рекомбинантных ферментов. Целесообразно было бы показать ход очистки в виде традиционной таблицы, содержащей данные об изменении количества белка и активности на каждой стадии, а также о выходе целевого белка и достигнутой степени очистки. Наличие таких данных позволило бы оценить эффективность предложенного метода получения рибонуклеозидгидролазы.

4. В работе не во всех случаях корректно представлены результаты статистической обработки данных. Так, не обозначено, какому параметру (стандартное отклонение, доверительный интервал и т.п.) соответствуют погрешности для значений, приведенных в таблицах. Многие численные значения и их погрешности в таблице 10 округлены некорректно и приведены с незначащими цифрами. На рисунках 25, 26, 27, 28 и 35 значения экспериментальных ошибок отсутствуют.

5. Ряд подписей к рисункам в диссертационной работе следовало бы доработать. Так, в подписях к рисункам 28, 31 и 32 нет общего названия рисунка, представлены только названия отдельных панелей. Подпись к рисунку 20 не содержит расшифровки использованных на рисунке обозначений. На рисунке 29 для обозначения панели использована буква «Ё», что не принято.

Следует подчеркнуть, что высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности диссертационной работы, которая, безусловно, заслуживает высокой оценки.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, из которых 3 статьи – в высокорейтинговых журналах, а также тезисы 3-х докладов на конференциях. Публикации полностью отражают содержание работы.

Подводя итоги, можно констатировать, что диссертационная работа Леонида Александровича Шапошникова является завершенным квалификационным исследованием, выводы работы полностью подтверждены результатами различных экспериментов, автореферат и публикации полностью отражают основное содержание диссертации. Диссертация Л.А. Шапошникова соответствует специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология. Работа полностью отвечает критериям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова в

пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Автор работы Л.А. Шапошников, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, доцент, профессор РАН,
начальник лаборатории функциональной энзимологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»



Демидюк Илья Валерьевич

24 апреля 2024 г.

Контактные данные:

Телефон: +7(499)196-18-53, E.mail: Demidyuk_IV@nrcki.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Адрес места работы:

123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 2.

Подпись Демидюка И.В. заверяется

Главный ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»



К.Е. Борисов