

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.

Актуальность

Инфекционные бактерии рода *Klebsiella* представляют достаточно серьезную угрозу, поскольку способны быстро развивать устойчивость к антибиотикам, образуя биопленки. Эта особенность делает бактерии данного рода серьезной угрозой, прежде всего из-за распространенности внутри лечебных заведений. Повышается риск развития сепсиса. Лактобактерии рода *Limosilactobacillus* и *Lacticaseibacillus*, которые в норме входят в состав микрофлоры кишечника, проявляют антагонистические свойства по отношению к *Klebsiella*. Антагонизм обусловлен индуцибельным синтезом гидролаз белков и нуклеиновых кислот, разрушающих пептидогликан и геном *Klebsiella*. Одним из основных белков, обладающим гидролазной активностью по отношению к рибонуклеозидам, является рибонуклеозидгидролаза С (RihC). Однако физиологическая роль и структурно-функциональные характеристики данного фермента изучены весьма слабо.

Диссертация Шапошникова Леонида Александровича посвящена получению и изучению рибонуклеозидгидролазы С из бактерий *L. reuteri*, синтезирующейся в ответ на присутствие патогенных бактерий *Klebsiella*.

Был получен новый рекомбинантный фермент RihC из *L. reuteri* в двух вариантах с добавлением His-tag на N- или С-конец фермента, определены кинетические параметры с помощью новой разработанной методики определения ферментативной активности, термостабильность фермента, получены кристаллы, решена пространственная структура, определены ключевые остатки активного центра и изучена антибактериальная активность фермента и воздействие его на биоплёнки.

Содержание и завершенность работы

Диссертационная работа Шапошникова Л.А. построена по классической схеме. Она состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов», «Результатов и обсуждения», «Заключения», «Выводов» и «Списка цитируемой литературы». Диссертационная работа Шапошникова Л.А. изложена на 117 страницах, содержит 36 рисунков, 12 таблиц и включает в себя ссылки на 216 литературных источника. **Введение** отражает цель и задачи диссертационной работы, новизну и практическую значимость, оценку степени достоверности и описание апробации работы, содержит положения, выносимые на защиту, обобщение о публикациях, проведенных по результатам работы. **Обзор литературы** состоит из 2 глав, содержание которых отражает состояние исследований в области диссертационной работы. В первой главе приводятся общие сведения о пробиотическом организме *Limosilactobacillus reuteri*. Во второй главе описываются различные рибонуклеозидгидролазы. **Экспериментальная часть** работы изложена в главах «Материалы и методы» и «Результаты и их обсуждение». Завершается работа Заключением, Выводами и Списком литературы. **Заключение** отражает основные результаты данной работы. **Выводы** сформулированы четко, основаны на экспериментальных данных. **Список литературы** включает результаты самых последних исследований (доля статей за 2014-2024 гг. составляет более 40%).

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертационной работе, обусловлена достаточным объемом исследований и обширной методической базой, а также адекватным выбором методов для обработки данных. Полученный материал является достаточным для формулирования представленных выводов. **Научная новизна** диссертационного исследования и полученных выводов подтверждается четырьмя публикациями в рецензируемых журналах, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus, из которых

3 публикации в высокорейтинговых журналах, а также тремя тезисами докладов конференций.

Вся работа построена логично, эксперименты описаны подробно. Сначала приводится моделирование структуры фермента с добавлением His-tag для определения более выгодного положения этой вставки, затем показаны результаты клонирования и экспрессии двух форм фермента и отмечена разница в экспрессии двух форм. Далее приведено обширное описание разработки методики изучения ферментативной активности на основе метода гидрофильной хроматографии, выделены такие преимущества данной методики, как уменьшение затрат времени на проведение анализов, эффективность разделения анализируемых субстратов и продуктов ферментативной реакции. С помощью разработанной методики получены кинетические параметры ферментов с различными субстратами, изучена термостабильность фермента с помощью кинетики термоинактивации, а также дифференциальной сканирующей калориметрии. Следующим этапом в работе является достаточно подробное описание кристаллической структуры фермента, сравнение её с другими структурами ферментов типа RihC, описание активного центра и ключевых аминокислотных остатков. В заключительной части описаны эксперименты по изучению активности этого фермента против различных патогенных организмов, имеющих множественную устойчивость к антибиотикам, показано, что фермент в комбинации с меропенемом замедляет рост *K. pneumoniae* и *E. coli*, а также влияет на способность некоторых патогенов образовывать биоплёнки.

Вопросы и замечания

1. В работе была получена пространственная структура фермента после его кристаллизации, но помимо этого были также получены модели фермента с помощью AlphaFold2. Проводилось ли сравнение модельной и реальной структур?

2. Изначальной идеей работы являлось изучение фермента RihC на основании того, что фермент выделяется в лактобактериях в ответ на присутствие бактерий рода *Klebsiella*. Известен ли механизм такого действия и почему этот фермент должен помочь в борьбе с патогенами?

3. В дополнение к предыдущему вопросу, поскольку собственной антибактериальной активностью данный фермент, как отмечено в работе, обладает и, следовательно, пока что трудно сказать, можно ли его использовать против патогенов и как это лучше делать следующий вопрос: а как-то иначе данный фермент можно было бы применить на практике? В разделе научная новизна обозначено, что в работе «Разработана новая быстрая удобная методика определения ферментативной активности...». При этом не проведено сравнение данной методики с известными. В чем же заключается её быстрота и удобство?

4. В литературном обзоре в разделе 2.3. «Структура рибонуклеозидгидролаз» присутствуют рисунки 8 - 12, а также таблица 3, на которых представлены научные результаты для построения филогенетического дерева и аминокислотных выравниваний. Остается непонятным, получены ли эти данные исследователем самостоятельно (в таком случае, почему они находятся в главе «обзор литературы»?) или же заимствованы из других источников без соответствующих литературных ссылок.

5. В обзоре литературы не хватает иллюстративного материала описываемых событий. Суммирующие рисунки украсили бы работу. У большинства имеющихся рисунков имеется название, но отсутствует подпись, объясняющие суть рисунка. Это затрудняет понимание работы.

6. Работа изобилует сленговыми словосочетаниями. Например «самый экспрессный», «времена составляли» и пр.

Перечисленные замечания относятся преимущественно к оформлению работы и не снижают общего положительного впечатления от представленной диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Шапошникова Леонида Александровича является завершённой научно-квалификационной работой, в рамках которой был получен и изучен новый рекомбинантный фермент. Полученный фермент имеет хорошие каталитические параметры по сравнению с аналогичными ферментами, а также имеет потенциально полезный эффект при использовании его с известными антибиотиками для решения проблемы внутрибольничных инфекций и их возбудителей. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении учёных степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Автор работы, безусловно, заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», доктор биологических наук, доцент.

Жданов Дмитрий Дмитриевич

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.04 – Биохимия.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»
(ИБМХ)

Адрес: 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.8

Телефон: +7 (499) 246-33-80,

Электронный адрес: zhda[REDACTED]@mail.ru

[REDACTED]

03 мая 2024 г.

Подпись Иванов Д. Д.
заверяю [REDACTED]
Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.

