

**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.**

Диссертация Шапошникова Л.А. посвящена важной и актуальной проблеме больничных инфекций и антибиотикорезистентности и новым нестандартным методам борьбы с этой проблемой. В качестве такого нового решения предлагаются ферменты пробиотических штаммов человека, один из таких ферментов автор подробно изучил и описал в рамках своей работы.

В рамках диссертационной работы соискатель впервые получил новый рекомбинантный фермент из лактобактерий *L. reuteri* LR1, который синтезируется в них в ответ на присутствие бактерий рода клебсиелл. Автор подробно описал структурно-функциональные характеристики этого фермента, например, изучил кинетику расщепления различных нуклеозидов с помощью разработанной им методики для определения активности этого фермента. Данная методика оказалась не только самой быстрой и точной среди известных на данный момент, но и универсальной – она подходит для изучения ферментативной реакции с любым из рибонуклеозидов и для любого фермента семейства нуклеозидгидролаз. Помимо этого, соискатель получил интересные и перспективные результаты при изучении антибактериальной активности данного фермента с патогенами группы ESKAPE: синергизм с меропенемом против *E. coli* и *K. pneumoniae*, а также ухудшение образования биоплёнок некоторыми грамотрицательными штаммами бактерий.

Диссертационная работа Л.А. Шапошникова изложена по традиционному плану, состоящему из введения, обзора литературы, материалов и методов, использованных в работе, результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы из 216 ссылок, на 117 страницах, содержит 36 рисунков и 12 таблиц.

Обзор литературы разделён на две части. Первая часть посвящена описанию лактобактерий собственной микробиоты человека *L. reuteri*, их положительному воздействию на наш организм и возможным механизмам этого действия. Вторая часть посвящена семейству рибонуклеозидгидролаз, подробному сравнению различных типов ферментов этого семейства,

описанию их каталитических свойств и структуры. Обзор написан лаконично, но в полной мере отражает исследуемую автором тематику. Отдельно хотелось бы отметить филогенетический анализ ферментов, на основании которого построено красивое и наглядное филогенетическое дерево, позволяющее оценить разнообразие организмов, в которых были найдены ферменты семейства Rih.

В разделе «Материалы и методы» описаны реагенты и методы, использованные в экспериментах данной работы. Хотелось бы отметить большое количество самых современных методов и подходов из различных областей, которые использовал автор в своей работе – это методы биоинформатики, биохимии, физической химии, энзимологии, молекулярной биологии и генетической инженерии, а также аналитической химии. При этом все методы подробно описаны.

В экспериментальной части работы, которая описывается главой «Результаты и их обсуждение», Л.А. Шапошников подробно описывает полученные им результаты и делает из этих результатов выводы и предположения, каждый этап работ логически обоснован и необходим для подробного описания работы фермента. В начале работы автор проводит компьютерное моделирование изучаемого фермента с целью выявить предпочтительное положение для внесения последовательности His<sub>6</sub>, необходимой для упрощения очистки ферментов. Не получив однозначного ответа, автор клонирует свой фермент в двух вариантах, оценивает экспрессию полученных форм фермента, его олигомерное состояние. Далее соискатель описывает процесс разработки методики для определения ферментативной активности с помощью одной из вариаций ВЭЖХ – гидрофильной хроматографии (ГИХ). И хотя сам метод ГИХ не новый и активно используется в различных областях аналитической химии и даже в некоторых энзимологических работах, автор доказывает преимущества разработанной методики для изучения своего фермента – это значительно меньшее время проведения анализа, эффективное разделение нуклеозидов и азотистых оснований, простая пробоподготовка. Благодаря этой методике автор успешно изучил кинетические параметры и активность своего фермента с широким спектром субстратов, доказал важную роль иона кальция в катализе, изучил кинетику термоинактивации фермента при повышенных температурах. Термостабильность была также изучена и с помощью

дифференциальной сканирующей калориметрии, результаты двух методов хорошо согласуются. Помимо этого, была проведена кристаллизация фермента, получена пространственная структура, проведено подробное сравнение с другими ферментами RihC, описан активный центр исследуемого фермента и выдвинуты предположения о связи структуры и каталитических параметров для данного фермента, которые оказались лучшими из изученных на данный момент даже для менее предпочтительных субстратов, что является, безусловно, одним из преимуществ исследуемого в работе фермента. В заключительной части работы Шапошников Л.А. описывает различные эксперименты по изучению действия своего фермента на различные патогены с множественной устойчивостью к антибиотикам. И несмотря на отсутствие собственной антибактериальной активности у этого фермента, были получены и перспективные результаты в виде дополнительного замедления роста культур *E. coli* и *K. pneumoniae* при действии на них фермента и меропенема, а также в виде ухудшения образования биоплёнок некоторыми граммотрицательными штаммами патогенных бактерий.

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

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

1. На самом первом этапе работы автор проводит анализ известных структур RihC, чтобы определить положение для введения аффинного эпитопа. Исходя из этого анализа, сразу выдвигается предположение, что лучше вносить довесок на N-конец белка, что косвенно подтверждается при выделении рекомбинантного белка. Тем не менее отработка методики определения ферментативной активности белка проводится на препарате белка с аффинным эпитопом на C-конце. Автор показал, что методика работает и в дальнейшем ее с успехом использовал, но при чтении диссертации возникает закономерный вопрос о целесообразности использования фермента, активность которого может быть изменена из-за влияния эпитопа на структуру всего белка.

2. Более принципиальный вопрос касается целесообразности использования фермента с довеском в структуре и насколько полученные данные о ферментативной активности соответствуют истинным значениям активности нативного фермента. Возможно, стоило получить препарат белка без довесков, например, дополнив методику выделения стадией протеолитического отщепления аффинного эпитопа и использовать такой препарат белка для изучения его свойств.

3. При чтении раздела «Результаты и их обсуждение» часто не хватает сведений о том, как проводили опыт. Все эти сведения можно найти в разделе «Материалы и методы», но краткое описание процедуры облегчает восприятие информации о полученных результатах.

4. Автор доказывает, что изучаемый фермент образует тетрамеры при помощи гель-фильтрации, сравнивая время удерживания своего препарата с калибровочной зависимостью, полученной при использовании стандартов с известной массой. В тексте диссертации не хватает сведений о молекулярных весах использованных стандартов.

5. Большое внимание уделено преимуществу разработанной в данной работе методики определения ферментативной активности с помощью гидрофильной хроматографии. Именно эта методика используется для всестороннего изучения фермента в ходе работы. Автор подробно описывает ее преимущества в скорости проведения анализа и получения данных, но не описывает причины такого превосходства, которые скорее всего зависят от свойств носителя и процедуры проведения анализа.

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 3 тезиса докладов на конференциях. Публикации полностью отражают содержание работы.

Подводя итоги, можно с уверенностью сказать, что диссертационная работа Шапошникова Леонида Александровича 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 учёной степени кандидата химических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия и 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук  
профессор Химического факультета  
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова»  
Рубцова Мария Петровна

23 апреля 2024 г.

Контактные данные:

Телефон: +7(499)939-54-18, E-mail: rubtsovamp@my.msu.ru

Специальности, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

02.00.10 – Биоорганическая химия

03.01.03 – Молекулярная биология (хим. науки)



Адрес места работы:

119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1 стр. 40

Подпись Рубцовой М.П. заверяю.