

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шестака Никиты Викторовича
на тему: «Изучение каталитической и бактериолитической активности
рекомбинантного белка лизостафина из *Staphylococcus simulans*»
по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

Актуальность темы представленной диссертационной работы обусловлена очень серьезной проблемой современного здравоохранения, а именно антибиотикорезистентностью патогенных бактерий. Особое место в данной проблеме занимают антибиотикоустойчивые штаммы золотистого стафилококка (например метициллин- и ванкомицин-резистентные штаммы), которые вызывают широкий спектр различных заболеваний. Разработка препаратов на основе лизинов, эффективных в отношении пептидогликана бактерий, в том числе устойчивых к антибиотикам, является перспективным подходом для решения данной проблемы. В связи с этим научная и практическая значимость представленного Шестаком Н.В. исследования каталитической и бактериолитической активности антибактериального лизина лизостафина не вызывает сомнений.

Диссертация построена традиционно. Она включает в себя список сокращений, введение, главы «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», а также заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 139 страницах и содержит 48 рисунков, 6 таблиц и ссылки на 200 литературных источников.

Во введении удачно резюмированы актуальность и новизна работы, раскрыты предмет и объект исследования, а также цели, задачи, положения, выносимые на защиту и личный вклад автора.

В литературном обзоре Шестак Н.В. сначала кратко описывает проблему антибиотикоустойчивости золотистого стафилококка, затем уделяет особое внимание структуре пептидогликана бактерий, что помогает лучше понять следующую часть, в которой описываются структура и виды различных антибактериальных лизинов, расщепляющих связи в структуре пептидогликана. После этого диссертант более детально останавливается непосредственно на лизостафине, методам исследования его активности, влиянии иона металла в активном центре фермента на его активность и способам очистки препаратов рекомбинантного лизостафина. В целом обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Он написан хорошим языком, четко и логично, содержит ссылки на публикации последних лет, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о

том, что диссертант прекрасно ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам. Помимо этого, обзор полностью выполняет свою главную функцию — он хорошо готовит читателя к последующему восприятию экспериментального материала.

Экспериментальная часть работы начинается с описания материалов и методов исследования. В тексте детально описаны использованные методы как классической биохимии (электрофорез, хроматография и др.), так и биоинженерии (в области белковой инженерии). Особого внимания заслуживают разработанные Шестаком Н.В. методики получения вариантов рекомбинантного лизостафина с ионами различных металлов в его активном центре, обладающих разным уровнем активности, и основанная на ней методика восстановления активности рекомбинантного лизостафина.

В разделе «Результаты и их обсуждение» подробно разбираются основные результаты проведенных исследований. Описание начинается с разработки метода определения каталитической активности лизостафина на основе хромогенной реакции исходного пентаглицина и продуктов его гидролиза (ди- и триглиценов) с нингидрином. Следом описано исследование с использованием различных субстратов каталитической, пептидогликанолитической и бактериолитической активностей вариантов лизостафина с ионами различных металлов в его активном центре, которые варьируют в широких пределах. Впервые систематически установлены линейные зависимости пептидогликанолитической и бактериолитической активностей лизостафина от его каталитической эффективности. Также диссертантом было показано значительное влияние компонентов реакционной смеси на наблюдаемый уровень активности различных вариантов рекомбинантного лизостафина. Исходя из результатов падения уровня активности лизостафина вследствие возможного встраивания иона никеля в активный центр фермента, было сделано неочевидное, но логичное предположение, что выделение при помощи никель-хелатной аффинной хроматографии, которая часто применяется для выделения и очистки рекомбинантных белков, может приводить к падению уровня активности получаемого рекомбинантного лизостафина. Данное предположение было подтверждено исследованиями активности препаратов лизостафина, выделенных при помощи различных сорбентов. При этом установлено, что уменьшение активности лизостафина обусловлено взаимодействием с активным центром фермента ионов никеля, связанных с сорбентом. Кроме того, удаление ионов металлов из активного центра лизостафина и последующее включение нативного иона цинка приводит к полному восстановлению активности фермента, на основе чего Шестак Н.В. разработал метод восстановления активности рекомбинантного лизостафина. В качестве альтернативного

способа получения активного лизостафина предлагается использовать хроматографические сорбенты с высокой степенью связывания ионов металлов и/или сорбенты, содержащие нативные для лизостафина ионы цинка.

Выводы, сделанные автором в диссертации, полностью соответствуют полученным результатам. Новизна и достоверность описанных в работе результатов также не вызывает сомнений. Вынесенные на защиту положения обоснованы и соответствуют целям работы и поставленным задачам. Полученные при подготовке диссертации результаты использованы для публикации 4-х статей в международных рейтинговых изданиях, а также 3-х тезисов докладов на международных научных конференциях.

Диссертация Шестака Н.В. представляет собой законченное и цельное фундаментальное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Вместе с тем в работе есть некоторые недостатки. Так, при рассмотрении вопроса о потенциальном связывании никеля в основном или дополнительном сайте автор приводит мало структурной информации и не пытается разделить эти варианты или как-то обсудить такую возможность. В автореферате структурной информации (рисунка, схемы) просто нет, в диссертации это дано недостаточно. Отщепление иона никеля от Ni-NTA агарозы при очистке на колонке с этой смолой, безусловно, возможно, но на качественной смоле этого происходить, наверное, не должно. В связи с этим можно поставить вопрос о том, отмечали ли ранее другие авторы, использовавшие данный метод выделения белка, подобное явление. Также в тексте имеются отдельные небольшие погрешности и опечатки - например, одно и то же соединение обозначается и ЭДТА и EDTA (список сокращений), незаконченное предложение «...функции... разделены между различными доменами, которые При этом оба домена...» (стр. 32 диссертации), «столбики погрешностей» на рисунках (погрешности показаны не столбиками, а вертикальными линиями) и др.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным 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.

Таким образом, считаю, что соискатель Шестак Никита Викторович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией инженерии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Долгих Дмитрий Александрович

«28» сентября 2024 г.

Личную подпись
УДОСТОВЕРЯЮ.
ЗАВ. КАНЦЕЛЯРИИ
"30" сентября 2024

Контактные данные.

тел.: +7 (916) 734-50-93, e-mail: dolgikh@nmr.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.00.03 – «Молекулярная биология»

Адрес места работы:

117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория инженерии белка
Тел.: +7 (495) 335-28-88; e-mail: dolgikh@nmr.ru