

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Константинова Михаила Александровича «Протеолитические свойства секретируемых ферментов представителей рода *Lysobacter*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия»

Диссертационная работа М.А. Константинова посвящена исследованию двух малоизученных внеклеточных протеаз грамотрицательной почвенной бактерии *Lysobacter capsici* –  $\beta$ -литической протеазы (Vlp) и протеазы L5. Выбор объектов исследования обусловлен их высоким биотехнологическим потенциалом, который, однако, до настоящего времени оставался недостаточно реализованным из-за отсутствия полных данных о субстратной специфичности и каталитической активности этих ферментов. Тема диссертации является актуальной и имеет четкую прикладную направленность, поскольку бактериальные протеазы могут найти применение в медицине в качестве альтернативы конвенциональных антибиотиков для лечения ран, ожогов и борьбы с устойчивыми микробными биопленками, в биотехнологии для выделения из бактериальных клеток ДНК и белков, в пищевой промышленности для подавления роста патогенных бактерий в продуктах питания при их хранении, в сельском хозяйстве и ветеринарии для улучшения пищевых качеств кормов для животных.

Научная новизна работы М.А. Константинова не вызывает сомнений. Впервые с использованием методов масс-спектрометрии на большом пуле белковых субстратов проведен комплексный анализ аминокислотной специфичности Vlp и L5. Для обработки полученных данных автором разработана специализированная программа CleaveScore, позволяющая определять сайты гидролиза, формировать тепловые карты и логотипы последовательностей с применением нескольких методов нормализации. Автором разработана высокочувствительная универсальная система для определения кинетических параметров протеолитических ферментативных реакций методами масс-спектрометрии, в которой используется изотопно-меченные пептидные стандарты ( $^{18}\text{O}$ ). С помощью данной системы в работе впервые определены кинетические параметры протеаз Vlp и L5.

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о субстратной специфичности и каталитической активности внеклеточных протеаз бактерий рода *Lysobacter*. Так установлено, что металлопротеаза Vlp характеризуется узкой субстратной специфичностью, осуществляя гидролиз в основном по остаткам глицина и лизина в позиции P1. Сериновая протеаза L5 напротив имеет широкую специфичность, гидролизуя пептидные связи после остатков метионина, фенилаланина, лейцина и валина, причем особенно эффективно в случае расположения пролина в позиции P2. Также показано, что протеаза Vlp характеризуется значительно большей каталитической активностью по сравнению с L5, что отражается в более высоких значениях  $k_{cat}$  и  $k_{cat}/K_M$ . На основании выявленных различий выдвинуто предположение о функциональной роли этих ферментов у бактерий рода *Lysobacter*. Vlp, обладающая более высокой каталитической активностью, может выполнять функцию основного литического фермента, тогда как L5, характеризующаяся более широкой аминокислотной специфичностью, может являться вспомогательным ферментом, обеспечивающим гидролиз промежуточных пептидов.

Практическая значимость работы М.А. Константинова определяется возможностью использования созданного автором программного инструмента CleaveScore в протеомике и структурной биологии для анализа специфичности известных и новых протеаз. Автором впервые предложен и экспериментально валидирован универсальный подход к определению кинетических параметров протеолитических ферментов на основе методов масс-спектрометрии и изотопного обмена, который может найти широкое применение. Охарактеризованные автором ферменты Vlp и L5 могут быть использованы как альтернативные трипсину инструменты в протеомных исследованиях, а также для разработки новых антимикробных препаратов для борьбы с патогенными бактериями в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

Структура и содержание автореферата М.А. Константинова соответствуют требованиям. Материал логично и четко изложен на 25 страницах, выделены актуальность, цели, задачи и положения, выносимые на защиту. Представленные экспериментальные данные получены с использованием современных методов масс-спектрометрии и биоинформатического анализа. Результаты подробно представлены в виде рисунков, графиков, таблиц и тепловых карт, что облегчает восприятие. Выводы полностью обоснованы экспериментальными данными и соответствуют поставленным задачам.

Степень достоверности результатов обеспечена применением современных аналитических подходов, статистической обработкой данных, использованием референсных ферментов (трипсина) для валидации методов. Основные положения диссертации опубликованы в 3 статьях в рецензируемых журналах, 2 из которых соответствуют рубрике ВАК по специальности «Биохимия», и представлены на международных и всероссийских конференциях. Кроме того, получено свидетельство о регистрации программы для ЭВМ CleaveScore.

При ознакомлении с авторефератом возник вопрос. В работе показана высокая селективность  $V_{Pr}$  в отношении остатков глицина в позиции P1. С чем, по мнению автора, может быть связана столь выраженная специфичность (особенностями строения активного центра фермента, с конформационной доступностью глицина в составе белковых субстратов и др.). Кроме того, в качестве пожелания, хотелось бы видеть в автореферате более детальное описание схемы получения исследуемых ферментов и оценку качества используемых препаратов протеаз.

Возникшие вопросы и пожелания никак не влияют на общую высокую оценку работы и не умаляют ее значимость.

Таким образом диссертация Константинова Михаила Александровича «Протеолитические свойства секретируемых ферментов представителей рода *Lysobacter*» является завершённой научно-исследовательской работой, содержащей новые фундаментальные и практические результаты. Работа выполнена на высоком методическом уровне и полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Константинов Михаил Александрович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Кандидат химических наук  
(специальность 02.00.10 — биорганическая химия),  
старший научный сотрудник ГНЦ ИБХ РАН

Е.И. Финкина

03.04.2026 г.

Подпись Финкиной Е.И. заверяю:  
Заведующий отделом биоматериалов  
и бионанотехнологий, заведующий  
лабораторией молекулярной биофизики,  
руководитель группы перспективного  
научного планирования,  
учёный секретарь ГНЦ ИБХ РАН,  
доктор физико-математических



В.А. Олейников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо—Маклая, дом 16/10, телефон:+7(495)335—01-00, факс:+7(495)335-08-12, эл. почта: office@ibch.ru