

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Лазарева Василия Николаевича
на диссертационную работу Константинова Михаила Александровича
«Протеолитические свойства секретируемых ферментов представителей рода
Lysobacter»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.4. – «Биохимия»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Константинова Михаила Александровича посвящена исследованию протеолитических ферментов Vlp и L5, выделенных из бактерий рода *Lysobacter*, с целью установления особенностей их субстратной специфичности и каталитических свойств. Исследование выполнено с применением современных масс-спектрометрических методов анализа и направлено на решение задач, актуальных для современной биохимии ферментов, протеомики и аналитической химии.

Протеазы являются одной из наиболее распространённых и функционально значимых групп ферментов, участвующих в регуляции множества биологических процессов. Помимо фундаментального значения, они находят широкое применение в медицине, биотехнологии и молекулярной биологии. В последние годы особое внимание привлекают бактериальные протеазы, обладающие способностью разрушать клеточные структуры микроорганизмов. Такие ферменты рассматриваются как потенциальная основа для создания новых антимикробных средств, что приобретает особую значимость в условиях распространения антибиотикорезистентности. В связи с этим изучение протеаз бактерий рода *Lysobacter*, обладающих выраженной бактериолитической активностью, представляет значительный научный и практический интерес.

Существенной частью работы является установление закономерностей субстратной специфичности исследуемых ферментов на основе масс-спектрометрических данных. Несмотря на широкое использование LC-MS/MS-анализа в протеомных исследованиях, интерпретация результатов с точки зрения предпочтений аминокислот в окрестности сайтов расщепления остаётся сложной задачей. Для её решения в диссертации разработан программный инструмент CleaveScope, позволяющий проводить статистическую обработку данных о сайтах гидролиза и представлять результаты анализа в наглядной форме, включая частотные матрицы, тепловые карты и sequence-логотипы.

Другим важным направлением исследования является количественная характеристика каталитической активности ферментов. В работе использован подход, основанный на применении масс-спектрометрии в сочетании с изотопным ^{18}O -мечением, что позволяет определять начальные скорости протеолиза и рассчитывать кинетические параметры реакции. Такой метод расширяет возможности традиционных подходов ферментной кинетики и обеспечивает высокую точность количественного анализа продуктов гидролиза.

Таким образом, представленная диссертационная работа направлена на получение новых сведений о специфичности и кинетических характеристиках бактериальных протеаз и вносит вклад в развитие методов масс-спектрометрического анализа протеолиза.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста, содержит 36 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 156 источников. Диссертация состоит из словаря терминов и сокращений, введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, благодарностей, раздела о финансировании и списка литературы.

Во введении сформулированы цель и задачи исследования, обоснована актуальность выбранной темы, охарактеризованы научная новизна и практическая значимость работы, определён личный вклад автора, представлены основные положения, выносимые на защиту, а также сведения о достоверности и апробации полученных результатов.

В обзоре литературы рассмотрены современные представления о протеолитических ферментах и их бактериолитических свойствах, в том числе о ферментах бактерий рода *Lysobacter*. Проанализированы существующие подходы к изучению специфичности протеаз, методы определения их кинетических параметров, а также возможности применения масс-спектрометрии для анализа протеолиза и обработки получаемых данных. Отдельное внимание уделено методам количественной масс-спектрометрии с использованием изотопных меток. Глава «Материалы и методы» содержит описание используемых экспериментальных подходов и методик, включая методы определения специфичности ферментов B1p и L5 с применением MALDI-TOF масс-спектрометрии и LC-MS/MS, а также методические подходы к определению кинетических параметров протеаз с использованием количественной масс-спектрометрии и изотопно-меченых стандартов. В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты проведённых исследований, включая идентификацию внеклеточных протеаз бактерий рода *Lysobacter*, анализ протеолитической специфичности ферментов B1p и L5, разработку и применение программного инструмента CleaveScore для анализа сайтов гидролиза, а также определение кинетических параметров исследуемых ферментов с использованием

количественной масс-спектрометрии с метками ^{18}O . В заключении обобщены основные результаты исследования и сформулированы выводы.

Структура диссертационной работы последовательна и логична и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным исследованиям.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы заключается в получении новых данных о протеолитической специфичности и каталитических свойствах бактериальных ферментов V1p и L5, выделенных из бактерий рода *Lysobacter*. В работе впервые проведено комплексное исследование этих ферментов с использованием масс-спектрометрических методов, позволяющее сопоставить особенности аминокислотного окружения сайтов гидролиза с кинетическими характеристиками протеолиза.

Впервые на основе анализа продуктов гидролиза сложных белковых субстратов с использованием LC-MS/MS установлены закономерности субстратной специфичности данных ферментов. Показано, что протеаза V1p характеризуется относительно узкой специфичностью и преимущественно гидролизует пептидные связи после остатков глицина и лизина, а также в меньшей степени аргинина. Для фермента L5 выявлена более широкая субстратная специфичность и установлено существенное влияние аминокислотного окружения сайта гидролиза, в частности ингибирующее влияние остатка пролина в позиции P2.

В работе предложен и реализован новый вычислительный подход к анализу специфичности протеаз по данным LC-MS/MS, реализованный в программном инструменте CleaveScore. Использование данного метода позволяет проводить статистический анализ аминокислотного окружения сайтов гидролиза без априорных ограничений по специфичности фермента и выявлять закономерности распределения аминокислот вокруг сайта гидролиза.

Впервые для ферментов V1p и L5 определены кинетические параметры протеолиза с использованием количественной масс-спектрометрии и изотопного ^{18}O -мечения. Показана возможность применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для количественного определения продуктов гидролиза и расчёта кинетических характеристик протеаз. Полученные данные о кинетических параметрах исследуемых протеаз согласуются с установленными особенностями их субстратной специфичности и позволяют предположить их функциональную роль в природных условиях как ферментов, участвующих в антибактериальной защите.

Полученные в диссертационной работе результаты расширяют существующие представления о свойствах бактериальных протеаз рода *Lysobacter* и демонстрируют возможности комплексного применения масс-спектрометрических и вычислительных методов для анализа специфичности и каталитической активности протеолитических ферментов.

Научная и практическая значимость

Научная значимость диссертационной работы заключается в расширении представлений о механизмах протеолиза и особенностях субстратной специфичности бактериальных протеаз. Полученные результаты вносят вклад в понимание закономерностей взаимодействия протеолитических ферментов с белковыми субстратами и дополняют существующие сведения о свойствах протеаз бактерий рода *Lysobacter*.

Практическая значимость работы определяется разработкой и применением подходов к анализу специфичности и кинетических параметров протеаз с использованием масс-спектрометрических методов. Предложенный подход к количественной оценке продуктов гидролиза с применением изотопного ^{18}O -мечения может быть использован для определения кинетических характеристик других протеолитических ферментов.

Разработанный программный инструмент CleaveScope позволяет проводить статистический анализ аминокислотного окружения сайтов гидролиза по данным LC-MS/MS и может быть применён при исследовании специфичности различных протеаз. Использование данного программного средства упрощает обработку массивов масс-спектрометрических данных и позволяет проводить сравнительный анализ специфичности ферментов.

Установленные особенности протеолитической специфичности ферментов Vlp и L5 также позволяют рассматривать их в качестве перспективных инструментов для протеомных исследований, в частности для ферментативного расщепления белков при их последующей идентификации методом масс-спектрометрии.

Полученные в работе результаты и предложенные методические подходы могут быть использованы в исследованиях протеолитических ферментов, а также при поиске и характеристике протеаз с потенциальной антимикробной активностью.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и заключений диссертационной работы обеспечиваются использованием современных экспериментальных методов исследования, включая масс-спектрометрические методы анализа (MALDI-TOF и LC-MS/MS), а также применением корректных подходов к обработке и интерпретации полученных данных.

Сформулированные в диссертационной работе выводы логически вытекают из поставленных целей и задач исследования и подтверждаются представленными экспериментальными данными. Содержание автореферата и опубликованных научных работ отражает основные результаты диссертационного исследования. Тематика, объект и используемые методы исследования соответствуют специальности 1.5.4 – Биохимия.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях и представлены на научных конференциях в виде докладов и постерных сообщений. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, из которых 2 входят в перечень изданий, рекомендованных ВАК по специальности «Биохимия», а также 7 публикаций в материалах научных конференций. Кроме того, по результатам выполненных исследований получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Вопросы и замечания

1. Первой задачей работы являлось проведение идентификации литически активных протеаз во внеклеточной жидкости бактерий рода *Lysobacter*, обладающих активностью в отношении белковых субстратов. Во-первых, на мой взгляд, термин «внеклеточная жидкость бактерий» некорректен. Вероятно, имелась в виду культуральная жидкость. Во-вторых, несмотря на формулировку задачи в тексте отсутствует информация о методологии выделения этих протеаз из культуральной жидкости. При этом, получение белков из лизата печени крыс и их хроматографическое разделение описано достаточно подробно.
2. Отсутствуют также какие-либо характеристики белковых субстратов, используемых в работе, включая уже упомянутые объекты исследования - V1p и L5. Под характеристиками я понимаю электрофореграммы, хроматограммы, которые бы иллюстрировали чистоту, целостность препарата.
3. Стр. 105-106. Непонятно, что подразумевается под образцами печени и сыворотки: образцы от разных особей или разные фракции после хроматографического разделения одной пробы?

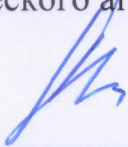
Тем не менее, замечания, вопросы и комментарии к работе не влияют на общую высокую оценку работы и не умаляют значимость работы.

Заключение

Таким образом диссертационная работа 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 научном 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».

Официальный оппонент:

Заместитель генерального директора по научной работе, заведующий лабораторией генной инженерии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», доктор биологических наук


Лазарев Василий Николаевич

Специальность – 03.01.03 Молекулярная биология

Почтовый адрес: 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

Тел.: +7 (499) 245-0471

Адрес электронной почты: lazarev@rcpcm.org

27 марта 2026 г.

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ
им. Ю.М.Лопухина ФМБА России
к.б.н.



Кострюкова Елена Сергеевна