

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Прокофьева Игоря Игоревича

«Селективность пиридинфосфорилазы холерного вибриона к природным нуклеозидам и ксенобиотикам по результатам рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования биомакромолекулярных комплексов»

по специальности 01.04.18 - «Кристаллография, физика кристаллов»

представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Диссертационная работа Прокофьева Игоря Игоревича посвящена исследованию селективности пиридинфосфорилазы к различным молекулярным соединениям, в том числе и субстратам, методом рентгеноструктурного анализа. Основной функцией исследуемого фермента уридинфосфорилазы является осуществление обратимой реакции фосфоролитического расщепления до азотистых оснований как уридина, так и меньшей эффективностью тимидина. Рациональное использование уридинфосфорилазы и её лигандов в медицине и биотехнологии требует знания структуры активного центра фермента. Также субстратную специфичность уридинфосфорилаз необходимо учитывать при разработке противоопухолевых, антибактериальных и антипаразитических препаратов. Как отмечено автором диссертации, в то время как химический аспект специфичности уридинфосфорилаз активно исследуется, то структурному аспекту субстратной специфичности уделяется недостаточно внимания. В этой связи, актуальность и практическая значимость диссертационной работы Прокофьева И.И. не вызывают никаких сомнений.

В представленной диссертационной работе проведено систематическое исследование пространственной структуры энзима из патогенной бактерии *Vibrio cholerae* с субстратами прямой и обратной реакции – анионом

фосфата, уридином, тимидином, урацилом и тиминном, а также псевдосубстратами - 6-метилурацилом и цитозином, что позволило, в купе с результатами молекулярного моделирования, всесторонне рассмотреть вопрос структурной основы субстратной специфичности уридинфосфорилаз.

Важная роль в диссертации Прокофьева И.И. отведена литературному обзору. В нем сравниваются все исследованные до настоящего момента структуры комплексов бактериальных и человеческих уридинфосфорилаз. Из него ясно, что многие результаты, полученные в диссертационной работе, относятся не только к рассматриваемой уридинфосфорилазе холерного вибриона, но и другим бактериальным уридинфосфорилазам. Подчеркивается важность исследования специфичности этого фермента для медицины и биотехнологий. Рассматривается биохимическая характеристика уридинфосфорилаз, специфичность фермента по результатам химической кинетики по отношению к различным лигандам, эти сведения в дальнейшем будут привлекаться при анализе результатов диссертационной работы. Описываются имеющиеся немногочисленные публикации по исследованию структурной специфичности уридинфосфорилаз. Подчеркивается, что до сих пор не были известны структуры комплексов уридинфосфорилазы со всеми ее субстратами, и потому не определены принципы субстратной специфичности уридинфосфорилаз. Таким образом, выбор объекта исследования диссертационной работы вполне обоснован.

В материалах и методах Прокофьев И.И. детально описывает оборудование, методики и программы, используемые им в работе, начиная с выделения, очистки и кристаллизации белка и заканчивая решением и уточнением структуры фермента. Причем подбор условий кристаллизации, съемка дифракционных картин на синхротронах PETRA III (Гамбург, Германия) и BESSY II (Берлин, Германия), решение, уточнение и анализ структур различными методами молекулярного моделирования проводились лично Прокофьевым И.И. Очевидно, что выбранные автором экспериментальные методы исследования объектов являются информативными и полностью адекватны целям и задачам исследования. Все семь пространственных структур комплексов, рассматриваемых в

диссертации, были депонированы в банк данных белковых структур, что подтверждает высокое качество проведенных экспериментов и корректность решения и уточнения структур. Широкий спектр исследованных структур комплексов позволил раскрыть структурные аспекты специфичности уридинфосфорилазы. Важно отметить, что разрешение полученных структур комплексов является высоким, либо атомным, что является необходимым требованием при исследовании структурной специфичности уридинфосфорилазы.

В диссертационной работе получен ряд конкретных результатов, обладающих научной новизной. Впервые найдены условия кристаллизации и выращены кристаллы уридинфосфорилазы из бактерии *Vibrio cholerae* в комплексах с фосфат-анионом, уридином, урацилом, тимидином, тиминном, цитозином и 6-метилурацилом, решена и уточнена пространственная структура этих комплексов. Исследованы конформационные изменения третичной структуры фермента при связывании с лигандами. Изучены ранее неизвестные аспекты, объясняющие большую избирательность фермента к уридину, урацилу и рибозо-1-фосфату в сравнении с тимидином, тиминном и 2-дезоксирибозо-1-фосфатом соответственно.

Важной частью работы Прокофьева И.И. стало объяснение отрицательной избирательности уридинфосфорилазы по отношению к цитозину и 6-метилурацилу. Так, взаимодействие метильной группы в 6-ом положении 6-метилурацила с аминокислотным остатком Thr93 энзиматического центра приводит к его выталкиванию из сайта связывания. В такой ситуации рибозная компонента и фосфатная группа фосфорилированных моносахаридов не образуют с Thr93 водородные связи, требуемые для проведения ферментативной реакции. Этот результат можно применять не только к 6-метилурацилу, но и расширить на другие пиримидины, имеющие химическую группу в 6-ом положении, объем которой больше, либо равен метильной группе.

Атомное разрешение структуры комплекса с цитозином позволило автору выявить таутомерию лиганда. На основании этого факта обоснована неспособность таутомера цитозина, который связывается с

уридинфосфорилазой, принимать участие в реакции фосфоролитического расщепления.

Результаты проведенного исследования имеют как фундаментальное значение и вносят существенный вклад в понимание структурных особенностей функционирования уридинфосфорилаз, так и практическое значение, т.к. необходимость знаний о влиянии различных групп фуранозной и пиримидиновой компонент лиганда обусловлена потребностью создания новых лекарственных препаратов. Ингибиторы и субстраты уридинфосфорилаз могут использоваться для лечения онкологических больных, а также заболеваний, вызванными бактериями и простейшими организмами. Помимо этого, уридинфосфорилаза является биотехнологически значимым ферментом.

Довольно обширные, детально сформулированные выводы полностью отражают основные научные результаты, представленные в работе. Выносимые на защиту положения полностью подтверждены и не вызывают сомнения. Результаты получены Прокофьевым И.И. впервые, являются оригинальными и пионерскими.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 14 публикациях, из которых четыре - это статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и прошли успешную апробацию в ряде крупнейших Российских и Международных конференциях и семинарах.

Как и любая большая работа, рецензируемая диссертация не лишена определенных недостатков. Приведу основные, на мой взгляд, замечания:

1. Для подтверждения полученных результатов было бы неплохо получить результаты химической кинетики для уридинфосфорилазы из холерного вибриона с лигандами.
2. Диссертация выиграла, если бы был проведен расчет методом квантово-механической/молекулярно-механической динамики, к примеру, для двойного комплекса с 6-метилуридином и анионом фосфата.
3. Для подтверждения выводов об отсутствии ферментативной активности по отношению к 6-метилурацилу и цитозину желательнее

провести мутационный анализ аминокислотных остатков, влияющих на субстратную специфичность.

Замечания рецензента являются недостатками редакционного характера и пожеланиями и не влияют на высокую оценку самой диссертационной работы Прокофьева И.И.

Автореферат диссертации с достаточной степенью полноты отражает содержание и смысл диссертации, хорошо иллюстрирован, четко описывает цели проведенных исследований, научную новизну работы, а также ее практические результаты – уже просматриваемые и перспективные.

Диссертация изложена четко, грамотно и аккуратно, с небольшим количеством опечаток. По объему полученных результатов, их новизне, актуальности, практической значимости представленная диссертационная работа Прокофьева И.И. полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным согласно п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, а ее автор, Прокофьев Игорь Игоревич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 - «Кристаллография, физика кристаллов».

Отзыв составил:

Официальный оппонент,

Качалова Галина Сергеевна,

Кандидат физико-математических наук,

Ведущий научный сотрудник НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

Телефон +7 (499) 1969539

Адрес электронной почты: gskachalova@gmail.com

Подпись Качаловой Г.С. заверяю:

Главный Ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский Институт»



31.05.2017.

С.Ю. Стремоухов