

## 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 специфичности фермента уридинфосфорилазы на основе ряда структур комплексов, полученных методом рентгеноструктурного анализа. Уридинфосфорилаза – это фермент, который катализирует реакцию фосфоролитического расщепления пиридиновых нуклеозидов и обратную реакцию их синтеза из (2-дезокс-)рибозо-1-фосфата и пиридиновых азотистых оснований. К числу исследованных структур относятся семь комплексов уридинфосфорилазы с различными субстратами и псевдосубстратами. Все рассматриваемые структуры получены при высоком либо атомном разрешении, благодаря этому в некоторых из них разрешены двойные положения отдельных участков молекулы фермента, окружающих сайт(ы) связывания лигандов. Полученные данные позволили не только исследовать структурные аспекты специфичности уридинфосфорилазы с беспрецедентно высокой точностью, но и указали на возможные конформационные перестройки и внутримолекулярные движения в активном центре фермента.

Работа выполнена на стыке молекулярной биологии, химии и физики. Актуальность работы обусловлена тем, что ингибиторы и субстраты уридинфосфорилазы являются перспективными препаратами в лечении

бактериальных и онкологических заболеваний. Результаты исследования выявили важные особенности функционирования уридинфосфорилазы и ее специфичности. Эти знания необходимы, как для фармакологических разработок, так и для использования фермента в области биотехнологии и биоинженерии.

Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов и списка цитируемой литературы, ее объем составляет 142 страницы, включая 41 рисунок, 9 таблиц и список литературы из 184 наименований.

Во введении дана краткая биохимическая характеристика пиримидинфосфорилаз, и уридинфосфорилазы в частности; приведено обоснование актуальности темы и необходимости структурных исследований уридинфосфорилазы; сформулированы цель и задачи работы; показана научная новизна, научно-практическая значимость; приведены положения, выносимые на защиту, и сведения об апробации диссертации.

Первая глава (литературный обзор) посвящена общему описанию класса пиримидинфосфорилаз. Описана роль уридинфосфорилазы в процессах метаболизма, идущих в прокариотических и эукариотических клетках, а также подробно рассмотрены перспективы использования лигандов этого фермента в медицине. Дается общее описание структуры бактериальных уридинфосфорилаз. Обосновывается предположение о том, что некоторые результаты, полученные в диссертационной работе, можно экстраполировать на уридинфосфорилазы из других организмов, ввиду высокой консервативности их активных центров. Суммируются разрозненные литературные данные о структурных аспектах субстратной специфичности уридинфосфорилаз.

Во второй главе дано подробное описание методов структурных исследований, которые применяли в работе. Описаны методики и условия кристаллизации белка и различных комплексов. Для получения рентгенодифракционных данных использовалось самое современное исследовательское оборудование: станции P11 синхротрона PETRA III (DESY, Гамбург, Германия), X13, синхротрона DORIS (DESY/EMBL, Гамбург, Германия), 14.1 синхротрона BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Берлин, Германия).

В главе приведены результаты решения и уточнения пространственных структур. Все перечисленные эксперименты выполнены лично Прокофьевым И.И.

Все семь пространственных структур комплексов, полученных в работе, были депонированы в банк данных белковых структур, что подтверждает корректность решения и высокое качество полученных структур. При их анализе автором также были применены методы компьютерного моделирования: белок-лигандный докинг, молекулярная динамика, квантово-механические расчеты, оценка энергии конформаций и связывания молекул.

В третьей главе анализируются полученные экспериментальные результаты. Описывается структурная организация уридинфосфоорилазы, анализируются конформационные изменения структуры фермента при связывании с лигандами и влияние кристаллической упаковки на конформацию функционально-значимых элементов структуры.

Автором впервые показано, что взаимодействие фосфат-аниона с ферментом фиксирует функционально-значимую петлю L11 в закрытой конформации, делая активный центр молекулы недоступным для связывания с нуклеозидами. При этом связывание нуклеозида в энзиматическом центре не приводит к гарантированной стабилизации петли L11 в закрытом состоянии, как считалось ранее. Полученные данные косвенно указывают на то, что фосфат-анион является вторым субстратом, входящим в активный центр. Благодаря высокому разрешению полученных структур Прокофьев И.И. выявил в некоторых из них двойные положения отдельных участков белка вблизи активного центра, включая петлю L11, которые не были обнаружены ранее при более низком разрешении. Таким образом, в рамках кристаллических структур фермента наблюдалась динамика активного центра при связывании с лигандами.

В третьей главе также приводится сравнение конформаций различных субстратов в сайтах связывания уридинфосфоорилазы. Показано, что наличие 2'-гидроксигруппы в молекуле уридина позволяет ей устанавливать большее количество водородных связей с белком по сравнению с тимидином. В свою

очередь это ведет к стабилизации сравнительно высокоэнергетической конформации рибозного фрагмента. Кроме того, проведенные квантово-механические расчеты позволили Прокофьеву И.И. предположить, что  $\beta$ -N1-гликозидная связь в молекуле тимидина в активном центре уридинфосфорилазы имеет меньшее локальное напряжение по сравнению с молекулой уридина. Таким образом, структурные данные, полученные в работе, позволили объяснить меньшую реакционную способность уридинфосфорилазы по отношению к тимидину.

Методом молекулярного докинга Прокофьевым И.И. получены модели комплексов фосфорилированных моносахаридов (вторых субстратов обратной реакции) с уридинфосфорилазой. Анализ комплексов позволил сделать вывод о том, что большая специфичность фермента к рибозо-1-фосфату в сравнении с 2-дезоксирибозо-1-фосфатом обусловлена, так же, как и в случае уридина и тимидина, взаимодействием аминокислотных остатков активного центра с 2-гидроксигруппой рибозного компонента.

В заключительной части третьей главы описана структура комплексов фермента с псевдосубстратами – 6-метилурацилом и цитозином. На основе полученных данных автором впервые объяснено отсутствие ферментативной активности уридинфосфорилазы по отношению к этим лигандам.

Все результаты получены Прокофьевым И.И. впервые, являются оригинальными и значимыми с точки зрения структурной биологии, медицины, фармакологии и биотехнологии.

Практическая значимость работы заключается в установлении влияния отдельных групп рибозной и пиримидиновой компонент на специфичность взаимодействия лигандов (субстратов, ингибиторов) с уридинфосфорилазой. К биологически-активным лигандам этого фермента относятся и некоторые пролекарства, например, 5-фторурацил. Перспективным является применение полученных знаний о специфичности уридинфосфорилазы для создания ее ингибиторов, которые могут использоваться для лечения онкологических и бактериальных заболеваний.

Основные результаты диссертационной работы прошли успешную апробацию на Российских и международных конференциях. Результаты представлены в 14 публикациях, из которых четыре – это статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК.

Представленная диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном и теоретическом уровне. В качестве недостатков, несколько не подвергающих сомнению основные результаты и выводы работы, я бы указал следующие.

1. В работе уделено мало внимания возможности взаимного влияния состояния/конформации отдельных каталитических центров уридинфосфорилазы друг на друга. В некоторых из полученных структур одновременно присутствуют как связанные с лигандами активные центры, так и не связанные. Это может косвенно указывать на аллостерические взаимодействия между шестью активными центрами фермента.

2. Энергию лигандов в работе оценивали, используя силовое поле (OPLS-2005). Безусловно, этот метод позволяет адекватно сравнить энергию различных конформаций, однако для решения подобной задачи целесообразнее было бы использовать квантово-механические расчеты. Тем более, что этот подход был использован для расчета парциальных зарядов. В пунктах 2.5 и 2.6 указано, что в расчетах учитывалось влияние растворителя, однако не указано каким методом это было сделано.

3. В тексте присутствует ряд опечаток и неточностей, например: (пункт 1.6.1) расстояние 20 Å – это расстояние между активными центрами одного димера, а не гексамера; (пункт 3.3.4) при анализе изменений координат отдельных C<sup>α</sup> атомов лучше использовать термин смещение, а не среднеквадратичное отклонение.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не могут существенным образом повлиять на общую, высокую положительную оценку работы. Автореферат диссертации адекватно и полно отражает содержание диссертационной работы, не смотря на большой объем полученных экспериментальных данных.

Суммируя сказанное можно заключить, что диссертация Прокофьева Игоря Игоревича на соискание ученой степени кандидата наук является научно-квалификационной работой, в которой содержится полное исследование структурных аспектов специфичности уридинфосфорилазы, имеющей существенное значение для медицины, биологии и биотехнологии.

По объему исследований, их новизне, актуальности и практической значимости представленная диссертационная работа Прокофьев И.И. полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным согласно п. 9 «Положениям 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:

01.06.2017

Официальный оппонент,

**Шенкарёв Захар Олегович,**

*Шен*

Доктор физико-математических наук,

Ведущий научный сотрудник Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая 16/10.

Телефон +7 (495) 330-59-29

Адрес электронной почты: [zakhar-shenkarev@yandex.ru](mailto:zakhar-shenkarev@yandex.ru)

ПОДПИС  
УЧЕНЫЙ  
ИБХ Р  
А.Ф.И.

