

ОТЗЫВ

официального оппонента к.х.н. Серебряковой Марины Васильевны
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 изучению специфичности и эффективности протеолитической активности двух ферментов V1p и L5, секретлируемых бактерией *Lyzobacter capsici*. Как правило, аминокислотная специфичность действия протеаз определяется с применением панели флуоресцентных или хромогенных субстратов. Однако такой метод не позволяет определить относительную эффективность в случае невысокой специфичности протеазы, либо, наоборот, выявить более сложные аминокислотные паттерны, узнаваемые ферментом. В данной работе предложен протеомный подход, при котором с использованием масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) анализируются все пептидные фрагменты, полученные под действием протеаз от сложной, разнообразной по белковой представленности, смеси. Разработано программное обеспечение CleverScore для сведения воедино и анализа масс-спектрометрических данных и представления их в наглядной графической форме - тепловых карт и логотипов паттернов узнавания. Для изучения кинетических параметров протеаз по масс-спектрам МАЛДИ-времяпролетной-МС проведены количественные расчеты скорости

образования пептидных продуктов из известных белков при смешивании их с O^{18} изотопно-мечеными стандартами, определены кинетические константы. Подобраны условия получения этих стандартов и созданы программы анализа сигналов на спектрах для расчета соотношения количеств образец/стандарт. Таким образом, в работе предложен комплексный универсальный масс-спектрометрический подход для характеристики протеаз, и это, несомненно, актуально при изучении протеолитических ферментов, получаемых из самых разных источников.

Структура и содержание диссертационной работы.

Работа изложена на 166 страницах, включает 36 рисунков и 9 таблиц, в списке использованной литературы приведено 156 источников, включая публикации последних лет.

Текст диссертационной работы следует стандартному плану – состоит последовательно из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, далее изложены результаты экспериментов и их обсуждение, заключения и выводы, завершает работу список литературы. Текст написан на хорошем русском языке, практически не содержит грамматических ошибок, излишних жаргонизмов и англицизмов.

Во введении обоснована актуальность работы, описана ее новизна и практическая значимость, определены цели и задачи исследования. В подробном литературном обзоре, изложенном на 57 страницах, собраны данные о протеолитических ферментах, секретируемых лизобактериями и родственными им грамтрицательными бактериями, подробно изложены масс-спектрометрические подходы, применяемые в протеомных исследованиях, как в технической части, так и в части анализа массивов данных. Глава материалы и методы на 13 страницах описывает экспериментальные и расчетные методики и использованные материалы. Основная глава (69 страниц) содержит результаты проведенных экспериментов, расчет и анализ, а также обсуждение. В заключении подведены итоги исследования, сформулированы выводы.

Структура работы логична и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям.

Научная и практическая значимость

Полученные данные позволили определить преимущественные сайты протеолиза ферментами V1p и L5, выделенными из *Lysobacter capsici*, широкого спектра белков, проанализировать паттерны узнавания, тем самым определить специфичность и спектр действия этих ферментов. Разработанные автором подходы к анализу большого объема масс-спектрометрических данных, позволяют наглядно и достоверно устанавливать сайты и паттерны узнавания/протеолиза широкого спектра белков различными протеолитическими ферментами. Разработанный метод определения кинетических параметров на основе МАЛДИ-времяпролетной масс-спектрометрии и ¹⁸O-меченых пептидов может быть применён для количественной оценки активности различных протеаз без использования флуоресцентных или иных меток.

Особый интерес представляет результат, полученный для фермента V1p – если ранее считалось, что его активность связана преимущественно с расщеплением пептидогликана оболочки грамотрицательных бактерий, то по факту он оказался высокоспецифичной постглициновой протеазой широкого спектра действия. Это расширяет возможности ферментативной обработки в протеомике при анализе белков, не имеющих удобных сайтов разрезания другими специфичными протеазами.

Данные работы могут иметь также прикладное значение для разработки антимикробных препаратов на основе ферментов *Lysobacter*.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Выводы, представленные в работе, обоснованы результатами экспериментов, проведенных автором. Эксперименты проведены на современном масс-спектрометрическом оборудовании с применением и квалифицированной доработкой подходов к анализу данных.

Выводы соответствуют поставленным задачам работы. Автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают содержание диссертационной работы и характеризуют результаты проведённых

исследований. Название и содержание диссертации по объекту и методам исследования соответствует специальности 1.5.4 Биохимия.

Основные положения работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, а также представлены в виде постерных докладов. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ – 3 статьи в рецензируемых научных журналах, 2 из которых соответствуют рубрикатору ВАК по специальности «Биохимия» и 7 в трудах конференций. Также получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Вопросы и замечания

1. В работе стоило бы привести более полные данные о выделении и очистке изучаемых ферментов, а также о проверке их чистоты. Если первая часть вопроса лежит вне сферы работы диссертанта, то вторую имело бы смысл привести наиболее полно, и, помимо данных о достоверности идентификации, приводить данные о поисках возможных примесей. Это существенно, поскольку результаты анализа протеазы Vpr намекают на возможность наличия в препарате примеси протеазы LysC, также секретируемой данной бактерией.
2. Поскольку результаты по протеолитической активности фермента Vpr указывают на его высокую специфичность, и на его возможность эффективно протеализовать широкий спектр белков, то вывод о целесообразности использования Vpr как высокоспецифичную постглициновую протеазу для разных, в первую очередь, протеомных исследований, можно было бы вынести отдельно.
3. Из опечаток – на стр.11, Основные положения, выносимые на защиту, в пункте 4 дублируются слова «для фермента».

Приведенные замечания никак не влияют на качество диссертационной работы и не умаляют значимости исследования.

Заключение

Диссертационная работа Константинова Михаила Александровича «Протеолитические свойства секретируемых ферментов представителей рода *Lysobacter*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия, является научно-квалификационной работой, имеет важное научно-практическое значение и отвечает всем требованиям, установленным в п. 3 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакциях с последующими изменениями), предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Таким образом, соискатель Константинов Михаил Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник отдела химии белка Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, кандидат химических наук,



Серебрякова Марина Васильевна

Специальность 02.00.10 Биоорганическая химия

Почтовый адрес: 119992, г. Москва, Ленинские Горы, дом 1, стр.40

Тел.: +7 903 713-62-00

Адрес электронной почты: mserebr@mail.ru

02 марта 2026г.

Исполняющий обязанности директора
НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова
Член-корр. РАН Сергиев. П.В

