



МИНОБРНАУКИ РОССИИ
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого»
(ФГАОУ ВО «СПбПУ»)

ИНН 7804040077, ОГРН 1027802505279, ОКПО 02068574
ул. Политехническая, д. 29 литера Б,
вн. тер. г. муниципальный округ Академическое,
г. Санкт-Петербург, 195251
тел.: +7(812)552-60-80, office@spbstu.ru

№ _____

УТВЕРЖДАЮ
проректор по научной работе

Фомин Ю.В.

2026 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Константинова Михаила Александровича «Протеолитические свойства секретлируемых ферментов представителей рода *Lysobacter*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность и значимость полученных автором диссертации результатов для развития науки

Для рационального использования бактериальных протеолитических ферментов в современной биотехнологии, фармацевтической и пищевой промышленности, а также в биохимических исследованиях необходимы методики для изучения их протеолитической активности, при этом существующие стандартные методы характеристики активности ферментов имеют ограниченную применимость. В связи с чем актуальной задачей является разработка методологии, позволяющей определять параметры работы ферментов, вне зависимости от их субстратной специфичности.

В данной работе был создан комплексный подход для изучения специфической протеолитической активности ферментов, а также кинетических параметров этого процесса, что может быть использовано для протеомных и биохимических исследований новых протеаз.

Научная новизна

В данной работе был создан новый алгоритм (программный продукт CleaveScore), позволяющий характеризовать специфичность различных (в том числе новых) протеаз с использованием данных масс-спектрометрии.

При помощи разработанной программы были впервые охарактеризованы сайты гидролиза внеклеточных протеаз V1p и L5 из *Lysobacter capsici*.

Впервые для данных ферментов были получены кинетические характеристики протеолитической активности по отношению к индивидуальным пептидам при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии при анализе

Практическая и теоретическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в возможности получения новых данных об аминокислотных последовательностях белков при помощи впервые охарактеризованных ферментов V1p и L5. Также созданный программный продукт CleaveScore позволяет анализировать специфичность новых ферментов, что может расширить представление не только о механизмах работы конкретных протеаз, но и о механизмах патогенности и процессах жизнедеятельности бактерий.

Практическая значимость работы состоит в возможности использования вновь охарактеризованных протеаз для идентификации белков при помощи масс-спектрометрии, а также в разработке метода определения кинетических параметров протеолитической активности ферментов при помощи изотопно-меченых стандартов ^{18}O .

Достоверность экспериментальных результатов и сделанных на их основе выводов

Диссертация представляет собой законченное научное исследование, в котором были получены следующие основные результаты. На первом этапе работы были идентифицированы и охарактеризованы две протеазы *Lysobacter capsici*. Затем был разработан оригинальный программный инструмент CleaveScore для анализа специфичности протеаз по данным LC-MS/MS. Впервые проведен масштабный статистический анализ сайтов гидролиза V1p и L5 (более 4600 уникальных сайтов) и установлена их аминокислотная специфичность. Для определения кинетических параметров протеаз был разработан метод с использованием ^{18}O -меченых стандартов пептидов и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Разработанный метод позволил впервые получить значения K_M , k_{cat} и k_{cat}/K_M для V1p (металлопротеаза, активная против MRSA) и L5 (сериновая протеаза с широкой специфичностью). Результаты работы подкреплены обширным литературным обзором и подробным описанием методов исследования. Достоверность выводов обеспечена современной методологией, статистической обработкой, валидацией на модельных системах, согласием с литературными данными и апробацией на международных и всероссийских конференциях. Следует отметить, что две из трех научных статей опубликованы в журналах, индексируемых в международных базах данных, первого квартала. Работа имеет высокую практическую значимость для протеомики и для разработки антимикробных препаратов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для развития соответствующей отрасли науки

Результаты имеют значение для развития биологических наук, в частности

биохимии протеолитических ферментов, протеомики и биотехнологии. Предложенный в работе подход — сочетание неселективного протеолиза с LC-MS/MS, биоинформатический анализ с помощью CleaveScore и количественная MALDI-TOF масс-спектрометрия с ^{18}O -меткой — может стать новым стандартом для характеристики любых протеаз с неизвестной или широкой специфичностью. Разработанный метод позволяет изучать ферменты, для которых нет коммерческих субстратов, и может быть распространён на другие классы гидролаз.

Рекомендации по использованию результатов и выводов, приведённых в диссертации

Программный инструмент CleaveScore, разработанный в данной диссертации, рекомендуется для использования в лабораториях, занимающихся протеомикой и изучением протеолитической активности ферментов, для автоматического анализа специфичности протеаз по данным LC-MS/MS.

Метод определения кинетических параметров с использованием ^{18}O -меченых пептидов может быть использован при изучении малоактивных протеаз или ферментов с нестандартной специфичностью, где классические методы (спектрофотометрия, флуориметрия) неэффективны.

Ферменты Vpr и L5, выступающие основными объектами исследования в данной работе, могут быть рекомендованы для использования в протеомном анализе в качестве дополнительных протеаз к трипсину.

Таким образом, результаты диссертации могут быть использованы в научно-исследовательской деятельности при изучении протеолитической активности новых ферментов, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области биохимии и биоинформатики, в частности в Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого, Научно-исследовательском институте гриппа, Институте экспериментальной медицины, СПбГУ, Научно-исследовательском институте физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского (МГУ) и других организациях.

Замечания и вопросы

Работа представляет собой завершённое научное исследование. Принципиальных замечаний к работе не имеется, однако в порядке дискуссии хотелось бы задать автору ряд вопросов.

1. Как могут быть использованы изученные вами протеазы для рутинных задач масс-спектрометрии для идентификации белков? В чем их отличие и преимущества по сравнению со стандартными протеазами?
2. Существует ли отличие в пептидных картах белков, полученных при обработке протеазами Vpr и L5, при разных временах инкубации? При разных температурах?
3. Как результаты, полученные в данной работе, позволяют решить задачу антибактериальной активности? Обладают ли эти ферменты бактериолитической активностью в свободном виде, а не в составе лизата?

Заключение

Диссертация Константинова Михаила Александровича на тему «Протеолитические свойства секретируемых ферментов представителей рода *Lysobacter*», по актуальности затронутых вопросов, научной новизне и практической значимости отвечает требованиям, установленным в п.п.9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, поскольку является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная для биохимии задача по созданию универсального подхода для характеристики специфичности и определения кинетических параметров протеолитической активности новых ферментов, а ее автор, Константинов Михаил Александрович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Диссертация обсуждена, и отзыв на диссертацию одобрен на заседании Высшей школы биомедицинских систем и технологий Института биомедицинских систем и биотехнологий ФГАОУ ВО СПбПУ (протокол № 6 от « 13 » марта 2026 г.).

Доцент Высшей школы биомедицинских систем и технологий, к.ф.-м.н.

Забродская Яна Александровна

Директор Высшей школы биомедицинских систем и технологий,
д.ф.-м.н., профессор

Власова Ольга Леонардовна

Директор Института биомедицинских систем и биотехнологий,
д.б.н., профессор РАН

Васин Андрей Владимирович

« 27 » марта 2026 г.

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Адрес: 195251, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Академическое, ул. Политехническая, д.29 литера Б

<https://www.spbstu.ru/>

Тел.: +7 (812) 775-05-30

E-mail: office@spbstu.ru