

Отзыв официального оппонента
на диссертацию Балаева Владислава Викторовича
СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ NR-II
СЕМЕЙСТВА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО
АНАЛИЗА И КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Работа посвящена установлению структурных особенностей субстратной специфичности пиримидинфосфорилаз семейства NR-II методами рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования, а также компьютерному моделированию потенциальных ингибиторов этих ферментов. Автором была проведена титаническая работа по определению методом рентгеноструктурного анализа пространственных структур ряда пиримидинфосфорилаз в апо-форме и в комплексе с субстратами и псевдосубстратами, а также выполнено всестороннее исследование методами молекулярного моделирования одного из этих ферментов – тимидинфосфорилазы из *Salmonella typhimurium* (*StTP*). В рамках данного исследования была изучена конформационная подвижность фермента, что позволило объяснить механизм его переходов между открытым и закрытым состояниями. Выполненный затем молекулярный докинг ряда соединений в активный центр *StTP* в этих двух состояниях позволил выявить предпочтительные ориентации лигандов и стабилизирующие межмолекулярные взаимодействия. Кроме того, молекулярная поверхность *StTP* была проанализирована на предмет наличия дополнительных сайтов связывания, свойства которых затем также были изучены. Все это дало возможность предложить ряд потенциальных ингибиторов пиримидинфосфорилаз, эффективность которых еще предстоит проверить экспериментально.

Актуальность решаемых задач определяется первостепенной важностью информации о пространственной структуре ферментов для понимания механизмов их функционирования. Не менее востребованной является и информация о взаимодействиях, образуемых молекулами фермента и субстрата при помещении последнего в активный центр. Полный учет таких взаимодействий позволяет как объяснить субстратную специфичность фермента, так и выбрать направление разработки его ингибиторов: потенциальных терапевтических или диагностических средств.

Диссертационная работа Балаева В.В. содержит 3 главы и список литературы. В литературном обзоре (Глава I) чрезвычайно подробно представлена информация о роли тимидинфосфорилазы (ТР) вообще и об ее вовлеченности в ряд заболеваний человека. Столь же подробно обсуждается структура этого фермента и детали организации его активного центра, в том числе по данным химико-кинетические исследований, которые уточняют структурные исследования и иллюстрируют уникальную специфичность этого фермента среди остальных пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз. Значительное внимание в литературном обзоре уделено и ингибиторам ТР различной природы. Экспериментальная часть диссертации (Глава II) содержит подробнейшую информацию о материалах, методах, программном обеспечении и вычислительных процедурах, использованных при получении результатов. Нельзя не отметить поразительную широту использованных методов: от молекулярно-биологических (клонирование и экспрессия генов, выделение и очистка белков) через собственно кристаллографические (кристаллизация, получение наборов интенсивностей, решение и уточнение пространственных структур) до вычислительных (молекулярный докинг и виртуальный скрининг, молекулярная динамика и квантовая механика). Неудивительно поэтому, что результаты (Глава III) изложены столь тщательно, сколь это вообще может быть уместно в диссертационной работе, а выводы полностью соответствуют представленным результатам. Список использованной литературы также весьма обширен и содержит современные публикации по всем затронутым в диссертационной работе вопросам. Всё вышесказанное подтверждает высочайшую квалификацию Балаева В.В., а представленная работа является законченным научным исследованием, проведенном на должном уровне и, несомненно, соответствует строгим критериям как отечественной, так и общемировой науки, что подтверждается собственными публикациями автора в ведущих научных журналах.

Вместе с тем, можно сформулировать несколько замечаний к изложению, которые, однако, не снижают уровень проведенного исследования.

1. Раздел II.9.1 озаглавлен "Термодинамическое интегрирование", хотя в дальнейшем идет речь про расчет потенциала средней силы методом зонтичной выборки.
2. При описании кристаллической упаковки исследованных ферментов приводится значение коэффициента Мэтьюса, но само это понятие не расшифровывается. Ничего не сообщается и о диапазоне его допустимых значений.

3. При рассмотрении междоменных взаимодействий в разделе III.3 вводится понятие междоменного угла θ , величиной которого определяется будет ли состояние фермента считаться открытым или закрытым. Однако есть сомнения, что относительно небольшое изменение угла (с $44 \pm 1^\circ$ до $49 \pm 1^\circ$ в случае $SrTP$) соответствует переходу из закрытого состояния в открытое. Возможно, в качестве индикатора открытости фермента следовало использовать какой-то другой угол, который варьируется в более широком диапазоне.

4. В таблице 15 (стр. 104) приведено значение некой "эффективности", для которой якобы установлена корреляция со значениями констант ингибирования. Однако незначительный диапазон изменения этого коэффициента ($-0,22 - -0,19$) по сравнению с диапазоном изменения констант ингибирования ($4,5 - 86$ мкМ), а также корректность самого подхода, использующего значения констант ингибирования для установления корреляций, вызывает вопросы. Возможно, именно этим объясняется и невысокий коэффициент корреляции ($r = 0,78$).

Несмотря на перечисленные замечания, представленная диссертация удовлетворяет требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 "Кристаллография, физика кристаллов".

Отзыв составил:

Официальный оппонент

Новоселецкий Валерий Николаевич

кандидат физико-математических наук

Доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ

Телефон: +7 910 434 99 28

Электронная почта: valeryns@gmail.com

2017

Подпись официального оппонента В.Н. Новоселецкого заверяю

Декан биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
академик



М.П. Кирпичников