

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Балаева Владислава Викторовича

«Субстратная специфичность нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства по результатам рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования»,

представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности
01.04.18 - «Кристаллография, физика кристаллов»

Диссертационная работа Балаева В.В. посвящена структурным исследованиям механизмов функционирования двух нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства. Ферменты данного семейства представляют собой гомодимер двухдоменных молекул с междоменным расположением активного центра. Нуклеозидфосфорилазы принимают участие в синтезе нуклеиновых кислот и имеют большое значение в противоопухолевой терапии. Данная работа весьма актуальна, поскольку позволяет прояснить важные закономерности в работе этих ферментов. Диссертация построена по классическому типу, состоит из введения, трех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем работы составляет 134 страницы, включая 35 рисунков, 15 таблиц и список литературы из 199 наименований.

Во введении диссертации четко указаны объекты исследования данной работы, обоснована их актуальность, поставлена цель и сформулированы задачи, описана научная новизна работы, представлены основные положения, выносимые на защиту и определен личный вклад автора.

Первая глава - обзор литературы, большая часть которого посвящена детальному анализу роли такого представителя пиримидиновых нуклеозидфосфорилаз, как тимидинфосфорилаза (ТР), в физиологических и патологических процессах в организме человека и структурным исследованиям её гомологов из *Escherichia coli* и человека в комплексах с различными лигандами. Рассмотрены различные ингибиторы ТР (производные пиримидина, пурина и ненуклеозидной природы) с точки

зрения разработки антиангиогенных препаратов. Кроме того, автором описано влияние широкоспецифической пиримидин нуклеозидфосфорилазы (PyNP) в бактериях рода *Mycoplasma* на фторпиримидиновую химиотерапию.

Отмечено, что до сих пор неизвестны структуры комплексов TP с субстратами и не определены принципы субстратной специфичности нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства. Указано, что препятствование PyNP фтопиримидиновой терапии обуславливает необходимость разработки ингибиторов, специфичных к PyNP, но неспособных связываться с TP, для создания противоопухолевых и антибактериальных препаратов.

Во второй главе диссертационной работы автором описываются эксперименты по выделению и очистке белков, их кристаллизации, получению и обработке дифракционных данных с кристаллов, решению и уточнению пространственных структур. Важно отметить, что все эксперименты по кристаллизации, сбору дифракционных данных на источниках синхротронного излучения BESSY II (Берлин, Германия) и PETRA III (Гамбург, Германия), а также определению структур белков и их комплексов проводились непосредственно Балаевым В. В.

В работе описано определение и уточнение семи пространственных структур нуклеозидфосфорилаз и их комплексов с лигандами, которые были депонированы в банк данных белковых структур. Автором проведено компьютерное моделирование с широким спектром методов: молекулярный докинг, классическая молекулярная динамика, квантово-механические/молекулярно-механические расчеты, определение свободной энергии связывания белок-лиганд методом зонтичной выборки.

Третья глава «Результаты и их обсуждение» посвящена сравнительному структурному анализу нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства на примере TP из *Salmonella typhimurium* и PyNP из *Bacillus subtilis*, обладающими разной субстратной специфичностью. Поскольку такие различия нуклеозидфосфорилаз могут объясняться как отличиями в их активных центрах, так и в общей организации этих биомолекул, Балаев В.В.

рассматривает обе возможности, успешно сочетая результаты рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования. Методом классической молекулярной динамики автор провёл сравнение возможности субъединиц этих ферментов переходить в закрытую конформацию. На основе результатов кластерного анализа и расчета угла между доменами, с использованием написанной Балаевым В.В. программы, определены вероятности перехода субъединиц этих ферментов в закрытое состояние. Показано, что вероятность перехода субъединицы PuNP из *B. subtilis* в состояние с закрытой конформацией значительно ниже, чем у субъединицы TP *S. typhimurium*.

Второй этап исследований - анализ различий в активных центрах этих ферментов. Автором был обнаружен один аминокислотный остаток фосфат-связывающего сайта, который отличается в этих ферментах. Для выявления влияния этой замены на протекание реакции Балаевым В.В. проведены квантово-механические/молекулярно-механические расчеты фосфат-связывающего сайта и вычислены частичные заряды атомов фосфатной группы в обоих ферментах. На основании совокупности результатов гибридных расчетов и классической молекулярной динамики автором делается вывод о различии механизмов протекания реакции в рассматриваемых ферментах, что может являться причиной их разной специфичности.

В диссертационной работе Балаев В.В. проводит сравнение комплексов TP с природными нуклеозидами и выявляет структурные особенности взаимодействия, которые объясняют высокую селективность этого фермента. На основании данных рентгеноструктурного анализа автором обнаружены и охарактеризованы два дополнительных нуклеозид-связывающих сайта.

Опираясь на полученные им результаты, автор провел виртуальный скрининг соединений, которые могли бы иметь сродство к фосфат-связывающему сайту PuNP, но не связываться с тимидинфосфорилазой. Структурные аспекты неконкурентного ингибирования тимидинфосфорилаз

автор исследует методом молекулярного моделирования и расчетов свободной энергии связывания белка с лигандом. Определенное автором данной работы соединение является важной опорной точкой для разработки селективных ингибиторов широкоспецифичных нуклеозидфосфорилаз в целях антибактериальной терапии. Необходимо отметить, что неконкурентные ингибиторы, в отличие от конкурентных, могут значительно отличаться от природных соединений, вследствие чего они будут связываться с меньшим числом побочных мишеней и, как следствие, обладать меньшей токсичностью.

В последних разделах третьей главы Балаевым В.В. описывается определение структуры уридинфосфорилазы *Yersenia pseudotuberculosis*, принадлежащей к NP-I семейству нуклеозидфосфорилаз, и исследование методами молекулярного моделирования связывания тимидинфосфорилазами и уридинфосфорилазами антибактериального препарата триметоприм. В результате автором делается вывод о том, что триметоприм может буферизироваться дополнительным нуклеозид-связывающим сайтом тимидинфосфорилазы, вследствие чего снижается эффективная концентрация лекарственного препарата внутри бактерии.

Все результаты получены Балаевым В.В. впервые, являются оригинальными и значимыми для медицинских исследований. Очень обширные, детально сформулированные выводы полностью отражают основные научные результаты, представленные в работе.

1. Методом рентгеноструктурного анализа определены пространственные структуры трёх нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства, как в свободном состоянии, так и в комплексе с различными лигандами.
2. На основании результатов рентгеноструктурного анализа определена структурная особенность активного центра тимидинфосфорилаз, вероятно, препятствующая расщеплению уридина.
3. На основании рентгеноструктурного анализа и квантово-механических расчетов обнаружено различие в окружении фосфат-аниона в тимидин-

специфичной и широкоспецифичной нуклеозидфосфорилазах NP-II семейства, приводящее к уменьшению частичного заряда кислорода фосфат-аниона в тимидинфосфорилазах. Методом классической молекулярной динамики установлено, что субъединица тимидинфосфорилазы с большей вероятностью переходит в закрытую конформацию, чем субъединица широкоспецифичной пиримидинфосфорилазы.

4. Методом виртуального скрининга определено соединение, способное взаимодействовать с фосфат-связывающим сайтом широкоспецифичной пиримидинфосфорилазы и не имеющее сродства к тимидинфосфорилазе.
5. Методом рентгеноструктурного анализа впервые определены два дополнительных нуклеозид-связывающих сайта тимидинфосфорилаз.
6. Методом молекулярного докинга установлено, что неконкурентный ингибитор TP KIN59 связывается со вторым дополнительным нуклеозид-связывающим сайтом.
7. Методом молекулярного докинга выявлено, что бактериостатический антибиотик триметоприм буферизируется в первом дополнительном нуклеозид-связывающем сайте TP. Показано, что триметоприм может буферизироваться активным центром уридинфосфорилазы и тимидинфосфорилазы, но конкурировать с нативным субстратом не может.

Практическая значимость работы заключается в разработке новых, менее токсичных соединений, способных регулировать активность TP. Условия кристаллизации пиримидинфосфорилаз NP-II семейства, определенные в рамках данной работы, могут быть использованы для будущих структурных исследований этих белков. Понимание пространственной организации и функционирования сайтов связывания нуклеозидфосфорилаз NP-II семейства является базой для рациональной разработки лекарственных препаратов – конкурентных и неконкурентных

ингибиторов этих ферментов. Результаты виртуального скрининга селективных ингибиторов широкоспецифичных нуклеозидфосфорилаз могут быть использованы для разработки и тестирования соответствующих антибактериальных препаратов. Определение сайта связывания неконкурентного ингибитора KIN59 и особенностей взаимодействия этого лиганда с найденным автором сайтом на молекуле TP является основой для оптимизации структуры этого ингибитора.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 14 публикациях, из которых четыре - это статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на международных и национальных конференциях и семинарах. Представленная диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, изложена четко, грамотно и аккуратно, хотя имеется некоторое количество опечаток и орфографических ошибок. Замечания и пожелания к данной работе:

1. В разделе «Влияние междоменных взаимодействий PyNP и TP на их субстратную специфичность» нет обсуждения того, почему меньшая вероятность нахождения PyNP в закрытой конформации может объяснить её широкую специфичность.
2. В разделе «Влияние различий пространственной организации фосфатсвязывающего сайта PyNP и TP на их субстратную специфичность» рассматривается моделирование замены Lys108 на Met108 для PyNP. Показано, что различия незначительны и высказано предположение, что близлежащие аминокислотные остатки Ala107 и Met109 могут также влиять на субстратную специфичность. В выводах автор, основываясь на структурных исследованиях активного центра и подвижности доменов, предполагает у TP и PyNP разные механизмы нуклеофильного замещения. На мой взгляд, для более достоверного подтверждения данного вывода необходим мутационный анализ аминокислотных

остатков, предположительно, влияющих на субстратную специфичность.

3. Кристаллизация, определение и анализ структур комплексов *TP* с ингибиторами KIN59 и/или триметопримом могло бы значительно повысить достоверность представляемых результатов.

Данные замечания совершенно не умаляют высокой оценки данной работы.

По объему исследований, их новизне, актуальности и практической значимости представленная диссертационная работа Балаева В.В. полностью отвечает требованиям ВАК РФ, а ее автор, Балаев Владислав Викторович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 - «Кристаллография, физика кристаллов».

Отзыв составил:

Официальный оппонент,

Светлана Викторовна Тищенко,

Доктор биологических наук,

Ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции ИБ РАН, 142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 4

Телефон: 8(496)7318474

Электронная почта: sveta@vega.preotres.ru

18.05.2017

