



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу ПЕТРОВА Максима Николаевича «Влияние экзогенных и эндогенных эффекторов на конформацию ангиотензин-превращающего фермента человека», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.00.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) – Zn-зависимая пептидаза, которая играет ведущую роль в регуляции сосудистого тонуса, определяет взаимосвязь ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем, а также влияет на метаболизм нейропептидов, на иммунную и репродуктивную функции, на развитие воспалительных процессов. Ингибиторы АПФ успешно используются при терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Характерная особенность АПФ заключается в том, что полипептидная цепь фермента сформирована двумя высокомолекулярными каталитически активными, но неравноценными доменами (N и C), взаимодействие между которыми зависит от структуры лиганда. Вместе с тем, оба домена имеют физиологическое значение, что подтверждается обнаружением в организме как соматической (двудоменной), так и тестикулярной (C-концевой однодоменной) форм АПФ (сАПФ и тАПФ). В последнее время было показано, что полезным инструментом для структурно-функционального исследования АПФ может служить использование моноклональных антител (мАТ) к ферменту. Идентификация эпитопов связывания ряда мАТ на поверхности его доменов открыла возможность применения антител для изучения механизма взаимодействия активных центров в ферменте и для выявления изменений конформации АПФ как под влиянием связывания различных лигандов (включая ингибиторы и некоторые эндогенные компоненты крови), так и при продуцировании фермента различными тканями или при химической модификации его молекулы. Такой подход был апробирован при изучении изменений АПФ, сопровождающих развитие болезни Гоше и саркоидоза. Он представляется также перспективным для исследования патологий,

характеризующихся накоплением в крови токсических соединений различной природы. Примером может служить уремия, при которой в крови наблюдается повышение концентрации глутатиона, способного восстанавливать дисульфидные связи в белках и, в частности, в АПФ. Изучение возможных конформационных изменений АПФ в составе крови больных уремией может привести к получению фундаментальных данных, важных для развития одного из направлений молекулярной медицины.

В связи с этим диссертационная работа М.Н. Петрова, целью которой явилось выявление конформационных изменений определенных участков поверхности ангиотензин-превращающего фермента, индуцируемых связыванием ингибиторов различной структуры, изучение влияния восстановления дисульфидных связей на конформацию фермента, а также поиск в крови больных уремией конформационно измененного АПФ и исследование его свойств, представляется весьма своевременной и актуальной.

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы (три главы), экспериментальной части, изложения результатов исследования и их обсуждения (четыре главы), выводов и списка цитированной литературы (212 наименований); объем работы 142 стр., она содержит 8 таблиц и 46 рисунков.

В обзоре литературы представлены сведения о физиологической роли и строении ангиотензин-превращающего фермента, о кристаллической структуре и взаиморасположении его доменов, суммированы данные об ингибиторах АПФ пептидной природы и их аналогах, приведена общая характеристика известных антител к ферменту и проанализированы возможности и преимущества применения последних для исследования структуры и функционирования АПФ. В целом, материал хорошо подобран и проработан и потому дает полное представление о современном состоянии вопроса. Обзор тесно связан с темой диссертационной работы М.Н. Петрова и служит хорошим введением к изложению собственных результатов автора.

Итогом анализа литературы, проведенного диссертантом, явилось заключение о перспективности использования панели моноклональных антител к АПФ (МАТ) как для изучения структурно-функциональных свойств фермента, так и для исследования его конформационных изменений, связанных с развитием некоторых патологических состояний.

Для работы автором была выбрана панель МАТ из 17 компонентов, включающая 9 МАТ к N-домену и 8 МАТ к С-домену АПФ. На первом этапе диссертант определил «базовые» характеристики связывания моноклональных антител как с соматической (сАПФ), так и с тестикулярной (ТАПФ) формами ангиотензин-превращающего фермента человека.

Затем был проведен систематический анализ влияния ингибиторов (эналаприлат, лизиноприл и тепротид) на связывание панели МАТ с ферментом. Выбор ингибиторов был

обусловлен различиями в их строении (два аналога трипептидов и нонапептид), приводящими к различиям во влиянии ингибиторов на междоменные взаимодействия в АПФ. Показано, что связывание ингибиторов в активных центрах фермента приводит к изменениям в связывании ряда компонентов панели МАТ, то есть индуцирует конформационные изменения в ферменте, которые в каждом случае оказались сходными для двудоменной и однодоменных форм. При этом действие эналаприлата и лизиноприла значительно отличалось от действия тепротида. Полученные результаты позволили диссертанту сделать заключение о том, что изменения конформации поверхности АПФ зависят от структуры используемого ингибитора. Кроме того, было установлено, что действие ингибиторов на фермент в составе семенной жидкости или плазмы крови приводит к качественным изменениям в эффектах связывания панели МАТ, что привело автора к заключению о возможном влиянии эндогенных компонентов биологической жидкости на связывание лигандов с ферментом и на его конформацию.

Интересно, что при изучении взаимовлияния доменов в соматическом АПФ под действием ингибиторов автором обнаружено, что связывание нонапептида тепротида в одном из активных центров фермента вызывает конформационные изменения соседнего домена, хотя ранее эффект междоменной кооперативности при взаимодействии этого ингибитора с ферментом не фиксировался.

На следующем этапе работы диссертант провел анализ конформационных изменений АПФ, происходящих в результате восстановления дисульфидных связей в ферменте под действием дитиотрептола и глутатиона. Было обнаружено изменение связывания ряда МАТ: тех, эпитопы которых включают зоны некоторых S-S-мостиков, а также тех, эпитопами которых являются конформационно чувствительные зоны на поверхности фермента. Важно отметить, что в модельном эксперименте по гемолизу эритроцитов М.Н. Петров подтвердил вероятность оказания глутатионом повреждающего действия на АПФ крови. Для характеристики возможных конформационных последствий разрыва дисульфидных связей автор привлек метод компьютерного моделирования. При этом на примере N-домена АПФ было показано, что утрата одного или нескольких дисульфидных мостиков может привести к нарушению движения по открыванию-закрыванию щели активного центра фермента.

Далее было показано, что конформационные ответы интактного АПФ и фермента с восстановленными дисульфидными связями на связывание ингибиторов значительно различаются, и эти различия определяются строением используемого ингибитора.

В заключительной части работы М.Н. Петров экспериментально подтвердил возможность изменения конформации АПФ в составе крови вследствие влияния значительных количеств эндогенных токсинов, присутствующих в крови пациентов с хронической почечной недостаточностью. Диссертанту удалось выявить конформационные

изменения фермента, предположительно опосредованные высоким содержанием глутатиона, у ряда больных, страдающих уремией. Установлено, что модифицированный фермент проявляет повышенную активность по отношению к природному субстрату ангиотензину-1, но является значительно менее чувствительным к действию ингибиторов, применяемых при терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы. На основании полученных результатов автором разработан подход, позволяющий выявлять пациентов с пониженной восприимчивостью к терапии ингибиторами. Этот подход заключается в фенотипировании АПФ индивидуальных больных путем одновременного контроля соотношений связывания антител 1G12 и 9B9 к N-домену фермента и энзиматической активности по субстратам Z-Phe-His-Leu и Bz-Gly-His-Leu в плазме (сыворотке) крови. Важные в медицинском аспекте данные, полученные М.Н. Петровым в заключительной части диссертационной работы, следует рассматривать как несомненный успех автора.

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать заключение, что М.Н. Петров успешно решил поставленные перед ним задачи и при этом проявил себя как высококвалифицированный специалист, владеющий широким арсеналом самых современных методов исследования в области физико-химической биологии, биокатализа и белковой химии, включая методы компьютерного моделирования и молекулярной динамики.

Обсуждение результатов работы отличается ясностью и четкостью изложения. Следует отметить особую тщательность в постановке и проведении экспериментов (в частности, во избежание ошибок в оценке активности фермента автором проводилось определение соотношения скоростей гидролиза двух субстратов, а для исключения влияния источников ферментов на полученные результаты наряду с природными формами АПФ были использованы рекомбинантные формы фермента). Достоверность полученных результатов обеспечена большим количеством проведенных экспериментов и хорошей статистикой.

Выводы диссертационной работы аргументированы и логичны; они полностью отражают полученные результаты. Обоснованность полученных результатов подтверждена апробацией основных положений и выводов на российских и международных научных конференциях.

Диссертационная работа М.Н. Петрова, несомненно, заслуживает самой высокой оценки. Вместе с тем, по материалам диссертации можно сделать некоторые замечания. Так, отсутствие иллюстрации, отражающей полную аминокислотную последовательность ангиотензин-превращающего фермента человека с указанием местоположения активных центров, элементов вторичной структуры, сайтов гликозилирования и S-S-связей, затрудняет восприятие излагаемого материала. Неудачно выбрана аббревиатура для субстратов – производных пептидов, в которой случайные обозначения аминокислот сосуществуют с

обозначениями из классического однобуквенного кода, что может приводить к путанице при чтении текста. Неудачными также следует признать названия параграфа 6.1 («Выбор условий отмывки планшетов при иммуносорбции»), посвященного подбору условий полного удаления несвязавшегося лиганда, и главы 7 («Определение влияния эффекторов на эффективность связывания моноклональных антител...»). Кроме того, на стр. 4 автореферата не указано наличие главы 8 в диссертационной работе. Изложенные замечания относятся исключительно к оформлению работы, но не касаются ее существа и не влияют на выводы.

В целом, диссертация М.Н. Петрова представляет актуальное завершённое научное исследование, в результате которого получены новые данные, имеющие как существенное теоретическое, так и важное практическое значение. Работа выполнена на самом высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основное содержание диссертации.

На основании вышеизложенного следует сделать заключение, что диссертационная работа Максима Николаевича Петрова на тему «Влияние экзогенных и эндогенных эффекторов на конформацию ангиотензин-превращающего фермента человека», является научно-квалификационной работой высокого уровня и полностью соответствует всем требованиям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней» в редакции Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.00.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент
вед. науч. сотр. лаборатории химии протеолитических
ферментов Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
доктор хим. наук, проф.

/Т.В. Ротанова/

Подпись д.х.н., вед.н.с. Т.В. Ротановой заверяю.
Ученый секретарь Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
доктор физ.-мат. наук



/В.А. Олейников/

09.10.2015

Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе Петрова Максима Николаевича на тему: «Влияние экзогенных и эндогенных эффекторов на конформацию ангиотензин-превращающего фермента человека», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 03.00.04 – биохимия и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Основное место работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности
Ротанова Татьяна Васильевна	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), ведущий научный сотрудник лаборатории химии протеолитических ферментов	Доктор химических наук, профессор	02.00.10 – биоорганическая химия

Основные научные труды по теме диссертации:

1. Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. (2015) Влияние мутаций в инсерционном домене АТР-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* на ее функционирование. *Биоорган. химия*, 41 (5), 579-586.
2. Спиридонова В.А., Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Мельничук А.В., Гайнутдинов А.А., Ротанова Т.В. (2015) Взаимодействие ДНК-аптамеров с АТР-зависимой Lon-протеазой из *Escherichia coli*. *Биоорган. химия*, 41 (6), 696-700.
3. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. (2014) Роль α -спирализованных доменов в функционировании АТР-зависимой Lon-протеазы из *Escherichia coli*. *Биоорган. химия*, 40 (6), 673-681.
4. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. (2013) Уникальная структурная организация АТР-зависимых Lon-протеиназ подсемейства A. *Биоорган. химия*, 39 (3), 303-319.
5. Li M., Gustchina A., Rasulova F., Melnikov E.E., Maurizi M.R., Rotanova T.V., Dauter Z., Wlodawer A. (2010) Crystal structure of the N-terminal fragment of *E. coli* Lon protease. *Acta Crystallogr., Sec. D, Biol. Crystallogr.*, 66 (Pt 8), 865-873.
6. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. (2010) Новый взгляд на строение некаталитической N-концевой области АТР-зависимых LonA-протеиназ. *Биомед. химия*, 56 (3), 412-419.
7. Мельников Э.Э., Ротанова Т.В. (2010) Молекулярные шапероны. *Биоорган. химия*, 36 (1), 5-14.

Вед. науч. сотр. лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН, доктор хим. наук, проф.

/Т.В. Ротанова/

Подпись д.х.н., вед.н.с. Т.В. Ротановой заверяю.
Ученый секретарь ИБХ РАН,
доктор физ.-мат. наук



/В.А. Олейников/

09 октября 2015 г.

Почтовый адрес – 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, тел.: +7(495) 335-4222; факс: +7(495) 335-7103, эл. почта: tatyana.rotanova@ibch.ru