

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дубовского Петра Викторовича «Мембраноактивные полипептидные токсины: взаимосвязь структура-функция», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9. – Биоорганическая химия

Диссертационная работа Дубовского П.В. посвящена исследованию двух разнородных по структуре классов полипептидов – жёстких (что обусловлено наличием в молекуле четырёх дисульфидных связей и ряда водородных/ионных связей, стабилизирующих характерную трёх-петлевую структуру молекулы) бета-структурных кардиотоксинов (КТ) из яда кобр и структурно-подвижных линейных пептидов (ЛП) из яда пауков (эти пептиды лишены дисульфидных связей, и поэтому, как правило, неупорядочены в водном растворе, но приобретают альфа-спиральную конформацию в определённых участках молекулы при взаимодействии с липидными мембранами и их моделями). Этим автор фокусируется на фундаментальной проблеме мембранологии, а именно, детализации явлений, происходящих на границе раздела липидная мембрана/вода в присутствии мембраноактивных пептидов. Причём в условиях, как правило, наблюдающегося конформационного обмена и/или высокой подвижности формируемой пептидной структуры. Это накладывает ограничение на применение дифракционных методов, использующих кристаллизацию объектов исследования, и теоретических методов, использующих предсказание пространственной структуры полипептидов и их поведение в мембранных средах с использованием методов молекулярной динамики (МД). Проблема решается в рамках единого методического подхода. Он основан на комбинации методов ЯМР высокого разрешения на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{15}N и широких линий на ядрах ^{31}P и доведён автором до получения практически значимых результатов – рационального конструирования антибактериальных пептидов на основе аминокислотных последовательностей КТ и ЛП. Однако только этими особенностями не исчерпывается актуальность проведённого исследования, на которой стоит остановиться более подробно.

Актуальность исследования. Одним из источников мембрано-активных пептидов является змеиный яд. Ядовитые змеи эволюционировали на относительно коротком временном промежутке, и их яд содержит сложную смесь токсинов, включая металлопротеиназы, сериновые протеазы и трехпетлевые токсины. Пептиды змеиного яда эволюционировали посредством набора генов и диверсификации, сформированных экологическим давлением, таким как захват добычи и защита. Яды змей, как известно, содержат ферменты, такие как фосфолипазы A2 и сериновые протеазы, которые обладают мощной биологической активностью. Долгое время существует интерес к цитотоксинам (кардиотоксинам, КТ) кобры. КТ – один из старейших представителей мембраноактивных полипептидов. Их мембраноактивные свойства изучаются уже более полувека. Именно это обусловило появление довольно разнообразных и часто противоречащих друг другу моделей взаимодействия КТ с биомембранами. Работа Дубовского П.В., несомненно, предлагая маятниковую модель взаимодействия КТ с

липидными мембранами, на которой основана новая классификация КТ, согласно их мембранной активности, наводит здесь определённый порядок. Также наметился прогресс в решении ещё одной задачи, а именно, насколько мембранная активность КТ определяет их цитотоксические, антибактериальные, гемолитические свойства. И, пожалуй, самое главное – теперь ясно, какие методические приёмы или их комбинации целесообразно использовать для изучения взаимодействия КТ с биомембранами. Представители каких групп КТ в рамках новой классификации остаются недостаточно структурно охарактеризованными в мембранных средах. Растущий объем доказательств *in vitro* и *in vivo* за последние 20 лет установил, что КТ являются перспективными кандидатами для разработки именно противораковых препаратов. И хотя клиническая трансляция остается на ранних стадиях из-за проблем, связанных с селективностью и токсичностью, в ряде случаев замечено, что их активность значительно превосходит таковую традиционных антираковых агентов, таких как цис-платина. Вероятно, рациональный выбор КТ для этих целей с учётом их мембранной активности позволит добиться более ощутимых результатов в этой области.

Альтернативным источником мембрано-активных пептидов является яд пауков. Пауки (Araneae), насчитывающие более 47 000 описанных видов и около (оценочно) 150 000 существующих видов, уже существовали на Земле более 300 миллионов лет назад. Их долгий эволюционный путь снабдил их компонентами яда, чтобы парализовать и убить свою добычу, которая часто во много раз больше их самих, что сделало их самыми успешными ядовитыми животными в эволюции. Функционально разнообразными компонентами ядов пауков являются ЛП, обладающие, как правило, сочетанным антибактериальным, противогрибковым, противораковым действием. Это делает их ценными прототипами потенциальных терапевтических агентов. В работе Дубовского П.В. исследуются антибактериальные свойства ЛП. Более того, этот аспект активности ЛП рассматривается в контексте фундаментальной проблемы селективности их действия в условиях липидных мембран различного фосфолипидного состава. ЛП оказываются более эффективными, чем классические антибиотики, особенно против резистентных бактерий. Это способствует их быстрому действию и снижению вероятности развития резистентности, что уже имеет прямое практическое применение.

Практическая значимость работы. В работе Дубовского П.В. изучено не только взаимодействие КТ и ЛП с модельными мембранами (фундаментальный аспект работы), но и рассмотрено взаимодействие этих мембрано-активных пептидов с бактериальными и клетками млекопитающих. Эти аспекты работы имеют несомненное практическое значение. Например, несомненную ценность представляет изучение антибактериальной активности КТ и, что не менее важно, пептидов, представляющих собой их фрагменты. Эта часть работы обосновывает целесообразность использования в этих целях именно ЛП из яда пауков. Но не полноразмерных пептидов, присутствующих в яде, а отобранных из фрагментов

аминокислотных последовательностей ЛП, например, с помощью ряда нейросетевых программ, натренированных на отбор пептидов, активных в отношении определённого штамма микроорганизмов. Не меньшую ценность представляет структурно-функциональное изучение ряда активных/неактивных в отношении золотистого стафилококка ЛП. Показана важность С-концевого амидирования, минимального положительного заряда пептида, определяющего водорастворимость пептида. Последнее свойство, наряду с присутствием в молекуле гидрофобного якоря на N-конце, существенно влияют на активность пептида. Достаточно обоснованным и интересным выглядит заключение о роли состава тройки N-концевых аминокислот гидрофобного якоря. Эта тройка отвечает за взаимодействие с головкой молекул фосфолипидов. Минимизация этого взаимодействия с головкой фосфатидилхолина (ФХ), по мнению автора, минимизирует гемолитическую активность пептида. При увеличении этого взаимодействия с фосфатидилглицерином (ФГ) растёт антибактериальная активность пептидов отношении грам-положительных микроорганизмов. Этот вывод не только практически значим, но и представляет несомненную новизну.

Новизна работы. Связана с решением ряда актуальных фундаментальных задач исследования взаимодействия мембрано-активных пептидов с липидными мембранами. Для КТ предложена маятниковая модель взаимодействия с липидными мембранами. Наблюдается ли здесь специфичность? В работе Дубовского П.В. отмечается, что для КТ эта специфичность определяется присутствием анионного фосфолипида в составе липидной мембраны. С незаряженными мембранами, сформированными из смеси цвиттерионных или нейтральных липидов, КТ взаимодействуют значительно слабее. Другое дело ЛП. Интересные свойства демонстрирует латарцин-1. Этот пептид способен дестабилизировать мембраны, сформированные из ФГ. Но, если сформировать мембрану из смеси ФГ/фосфатидилэтаноламин (ФЭ), дестабилизации не наблюдается. Вероятно, формируется комплекс латрцин-1/ФЭ, который препятствует проникновению пептида вглубь бислоя, что необходимо для дестабилизации. Автором исследования выдвинута гипотеза, что существует код специфичности взаимодействия ЛП с фосфолипидами. Показано, что экспериментально его можно обнаружить исследованием встраивания пептида в мицеллы, сформированные из целевого лизолипида (аналога фосфолипида, селективность взаимодействия с которым представляет интерес). Достаточно короткий размер пептида (13-14 аминокислотных остатка) позволяют его структурно исследовать в такой среде методом ЯМР без изотопного мечения, на естественном содержании изотопов ^{13}C , ^{15}N и без получения полностью дейтерированного лизолипида. Кроме того, органическим дополнением служат данные ^{31}P -ЯМР, полученные на фосфолипидных липосомах, сформированных из диацильного фосфолипида с такой же головкой, что и лизолипид для формирования мицелл. Хотя, надо отметить, эти данные могут быть заменены на, по информативности эквивалентное, исследование утечки красителя из липосом, сформированных из интересующего липида.

Достоверность исследования. Подтверждается наличием достаточного числа упоминаемых в тексте работы структур КТ, ЛП и их химических сдвигов, депонированных в банк данных rcsb.org и bmrб.io, соответственно. Кроме того, приводимые в работе экспериментальные ^{31}P -ЯМР спектры аппроксимированы теоретическими зависимостями с определёнными в результате подгонки с использованием разработанной Дубовским П.В. с соавторами программы P-Fit (программа оригинальна и не имеет аналогов, несмотря на то, что она описана в публикации, датированной 2006-м годом). Подгонка (аппроксимация экспериментального спектра теоретическим) позволяет получить значения тензора анизотропии химического сдвига на ядре ^{31}P и деформируемость липосом в магнитном поле в предположении их эллипсоидальной формы, которая действительно подтверждается данными электронной микроскопии. Значения рКа остатков гистидина в ЛП также определены аппроксимацией зависимости химического сдвига протонов имидазольного кольца от рН теоретической зависимостью с оценкой среднего значения и среднеквадратичного отклонения. Структура комплекса пептида Р9/лизолипид (лизопальмитоилФГ), хотя и не депонирована в PDB-банк (депонирована отдельно структура пептида), достаточно подробно описана. Имеются таблица, в которой приводятся межмолекулярные NOE-контакты, использованные для расчёта комплекса пептид/лизолипид и статистика расчёта с использованием хорошо зарекомендовавшей себя программы расчёта пространственных структур полипептидов CYANA. Исследования антибактериальной, цитотоксической, гемолитической активности КТ и ЛП выполнены в достаточном числе повторов, обеспечивающих статистическую значимость наблюдения. Для оценки вторичной структуры ряда ЛП (аналогов пептида Oxt4a) используется спектроскопия Кругового Дихроизма (КД). Хотя использование КД документировано не очень подробно, эти измерения имеют вспомогательное значение, т.к. имеющаяся ЯМР-структура исходного пептида (Oxt4a) позволяет достаточно уверенно прогнозировать структуру производных аналогов. Учитывая вышесказанное, необходимо признать, что полученные в работе Дубовского П.В. результаты достоверны, а все сделанные выводы выглядят достаточно аргументированными.

Структура диссертации. Работа Дубовского П.В. состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), результатов и обсуждения (Глава 2), описания использованных материалов и методов (Глава 3). За ними следуют не включённые в отдельные главы разделы: заключение, выводы, список использованных сокращений и список цитированной литературы.

Во введении обосновывается актуальность исследования, описывается её цель, научная новизна и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, данные об апробации работы, и публикации автора.

В литературном обзоре (Глава 1) рассматриваются данные о взаимосвязи структура-активность для КТ и ЛП. Перу автора принадлежит 7 обзоров, посвящённых этим полипептидам. Поэтому материал Главы 1 частично перекликается с этими публикациями. Совершенно новый материал приведён в

разделе 1.3. (Дизайн антимикробных пептидов, АМП), где сжато, но достаточно информативно описаны методы дизайна АМП, в том числе с использованием нейронных сетей. Можно рекомендовать автору опубликовать и этот материал в виде обзора, который можно дополнить данными структурно-функционального изучения ряда фрагментов ЛП, полученными в ходе данной работы. Такой обзор был бы очень актуален и востребован читателями как отечественной, так и зарубежной научной периодики.

Результаты и обсуждение (Глава 2) описывают структурные исследования КТ в водном растворе и модельных мембранах. Эти работы базируются на структурном исследовании изотопно-меченного ^{13}C , ^{15}N -КТ, полученного впервые в ИБХ. С его помощью детально охарактеризованы две формы КТ, между которыми в водном растворе происходит медленный конформационный обмен. Эти две формы присутствуют в растворе одновременно. Обмен происходит из-за цис-транс изомеризации пептидной связи X-Pro8, присутствующей в окончании петли-1 ряда КТ. Надо отметить, что один из таких КТ исследован в соавторстве с исследователями из Института кристаллографии РАН с помощью рентгеновской дифракции. Показано, что в кристалле есть только одна форма, где указанная связь имеет транс-конфигурацию. КТ воспринимается как структурно жёсткий пептид, если используется только рентгеновскую дифракцию для структурной характеристики этих токсинов. Но надо отдавать себе отчёт, что в растворе наблюдается конформационный обмен и о нём только можно догадываться, если не использовать для дополнительного контроля ЯМР-спектроскопию. Далее автором изучено взаимодействие ряда КТ с мицеллами додецилфосфохолина методом ЯМР. Показано, что в мицеллу окончаниями всех трёх петель молекулы встраивается только форма с транс-конфигурацией связи X-Pro8. В конформере с цис-связью в водную фазу экспонирован амидный протон остатка X. Это делает энергетически невыгодным встраивание этого конформера в мицеллу и, очевидно, липидную мембрану. Изучение взаимодействия ряда КТ с липосомами, сформированными из ФГ показывает, что присутствие остатка Ser28 в окончании петли-2 значительно затрудняет встраивание молекулы КТ в мицеллу и липидный бислой. Данные ЯМР в мицелле показывают, что ряд остатков в окружении Ser28 находятся в конформационном обмене в миллисекундной временной шкале. При этом структура окончания петли-2 изменяется, по сравнению с её конформацией в водном растворе. Такое изменение её структуры отражает адаптацию этой петли к мембранному окружению, если в ней присутствует остаток Ser28. Таким образом, взаимодействие КТ с липидными мембранами зависит от присутствия остатков в окончаниях петель-1 и -2 и названных «особыми». Исследование утечки флуоресцентного красителя из липосом, вызванных КТ, выделенных из яда разных кобр, приводит к выводу, что особый остаток присутствует и в окончании петли-3. Это позволяет сформулировать маятниковую модель взаимодействия КТ с липидными мембранами, объясняющую градацию мембранной активности разных КТ, зависящую от присутствия комбинации «особых» остатков в окончаниях петель КТ.

Переходя к структурному изучению ЛП из яда пауков, автор опирается также, главным образом, на ЯМР-спектроскопию. В мицеллах додецилсульфата натрия решена структура двух латарцинов, 1 и 2а. Но ^{31}P -ЯМР и утечка флуоресцентного красителя показывает, что латарцин-1 не способен разрушать липосомы, сформированные из бинарной фосфолипидной смеси ФЭ/ФГ, в отличие от латарцина 2а. Следовательно, структура и локализация ЛП в мембране определяются её липидным составом. Этот вопрос исследован более подробно в задаче дизайна АМП на основе фрагментов КТ и ЛП против золотистого стафилококка. Показано, что ряд АМП на базе ЛП действительно способны дестабилизировать мембраны ФГ и именно этим определяется их антимикробная активность против грам-положительных микроорганизмов. При этом наблюдается формирование комплекса пептид/ФГ, что продемонстрировано методом ЯМР с использованием мицелл, сформированных из лизоФГ. Таким образом, показано, что важно исследовать структуру ЛП в подходящем мембранном окружении.

В Главе 3 описаны использованные в работе реактивы, описывается синтез пептидов, приводятся использованные для аппроксимации зависимостей математические формулы, методики тестирования функциональной активности КТ и ЛП.

К работе нет принципиальных замечаний, которые бы повлияли на оценку высокого уровня проведенных исследований и поставили бы под сомнение достоверность полученных результатов. Тем не менее, есть ряд замечаний и рекомендаций, которые могли бы быть учтены для улучшения читаемости, восприятия диссертации и дальнейшего внедрения результатов описанных исследований в практику.

1. Несколько удивляет структура диссертационной работы. Почему-то раздел «Материалы и методы» следует за разделом «Результаты и обсуждение».
2. Эффективность предсказания активных АМП с использованием глубокого обучения нейросетей оказалась невысокой – около 20%. Это сравнимо с случайным угадыванием. Было бы полезно провести сравнение с другими методами предсказания (например, классическим машинным обучением) и обсудить причины низкой точности.
3. Автор исследовал гемолитическую активность спроектированных пептидов. Было бы интересно исследовать токсичность АМП по отношению к нормальной (не опухолевой) эукариотической клетке, например, фибробластам. Кроме того, если в будущем говорить о терапевтическом применении пептидов (об этом автор пишет в разделе 2.4.7), можно в перспективе исследовать стабильность и активность предсказанных активных пептидов в плазме крови.
4. Оценивалась ли доля правильно фолдированных пептидов при получении их с использованием рекомбинантной технологии?

5. В разделе «Результаты и обсуждение» много ссылок на литературные источники (и это логично). Но не всегда с первого взгляда можно понять, какие результаты получены автором лично, а какие взяты из литературы.

Заключение по диссертационной работе. Резюмируя, можно утверждать, что диссертационная работа Дубовского П.В. представляет собой оригинальное научное исследование в области биоорганической химии по исследованию двух структурных классов мембранноактивных пептидов: кардиотоксинов из яда кобр и линейных пептидов из яда пауков.

Результаты исследований, безусловно, представляют интерес для исследователей, работающих в областях биоорганической химии и структурной биологии.

Таким образом, диссертационная работа Дубовского Петра Викторовича на тему «Мембраноактивные полипептидные токсины: взаимосвязь структура-функция», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия удовлетворяет всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к докторским диссертациям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690), а ее автор Дубовский Петр Викторович заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

заместитель генерального директора

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России

по научной работе,

заведующий лабораторией генной инженерии

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России

доктор биологических наук

Лазарев Василий Николаевич

Подпись Лазарева В.Н. заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ

ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России

кандидат биологических наук

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России

119435, г.Москва, ул.Малая Пироговская, д.1а

телефон: +7(916) 635-24-55

адрес электронной почты: lazarev@rcrcm.org



/Е.С.Кострюкова/

16.09.2026