

Отзыв официального оппонента

Польшакова Владимира Ивановича на диссертационную работу Дубовского Петра Викторовича «Мембраноактивные полипептидные токсины: взаимосвязь структура-функция», представленную на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 «Биоорганическая химия»

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа П.В. Дубовского посвящена установлению взаимосвязи между пространственной организацией мембраноактивных полипептидных токсинов, особенностями их взаимодействия с липидными мембранами и проявляемой ими биологической активностью. В качестве основных объектов исследования выбраны два существенно различающихся по структурной организации класса соединений: трехпетлевые кардиотоксины яда кобр, представляющие собой компактные β -структурные полипептиды, стабилизированные системой дисульфидных связей, и преимущественно линейные мембраноактивные пептиды яда пауков, склонные к формированию амфифильных α -спиралей при взаимодействии с мембраной. Такое сопоставление позволяет рассматривать общие закономерности мембранного действия на существенно различающихся молекулярных платформах.

Актуальность проведенных исследований определяется как фундаментальными, так и прикладными обстоятельствами. Мембрана является одной из важнейших мишеней биологически активных пептидов, однако молекулярные механизмы их связывания, погружения в липидный бислой, структурной адаптации и последующего нарушения целостности мембраны остаются далеко не полностью выясненными. Особенно важным является установление структурных факторов, определяющих различия между антимикробной, цитотоксической и гемолитической активностью подобных соединений. В диссертации эта проблема рассматривается последовательно — от определения пространственной структуры токсинов и пептидов в водном растворе и мембраноподобном окружении до анализа нарушения ими свойств модельных мембран и действия на клетки.

Прикладная составляющая темы особенно актуальна в связи с необходимостью поиска новых антимикробных соединений, в том числе активных в отношении антибиотикорезистентных микроорганизмов. Автор не ограничивается изучением природных токсинов, а использует выявленные структурно-функциональные закономерности для создания укороченных антимикробных пептидов и разработки алгоритма их отбора с применением нейронных сетей. В качестве одной из целевых моделей выбран метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA). Таким образом, фундаментальный анализ механизмов мембранного действия непосредственно связан в работе с задачей рационального конструирования новых биоактивных соединений.

Следует особо отметить, что актуальность работы определяется не только потенциальной фармакологической перспективностью изучаемых соединений. Существенную самостоятельную ценность представляет разработка и совершенствование методологии исследования белково-липидных и пептид-липидных взаимодействий с использованием ЯМР высокого разрешения, исследованием мембранных систем на ядрах ^{31}P , рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования.

В целом тематика диссертационной работы представляется современной и востребованной и соответствует одному из активно развивающихся направлений биоорганической химии, находящемуся на стыке структурной биологии, биофизики мембран, токсикологии и поиска новых биологически активных пептидов.

Структура и общая характеристика диссертации

Диссертация представляет собой крупное, завершённое исследование объемом 367 страниц. Работа построена достаточно логично и включает введение, три главы,

закключение, выводы, список сокращений и библиографию. Структура диссертации логична и позволяет проследить переход от современного состояния проблемы к собственным исследованиям автора.

Первая глава содержит подробный анализ литературы по трем взаимосвязанным направлениям: структуре, мембранной и биологической активности кардиотоксинов кобр; структуре и активности линейных пептидов пауков; современным подходам к конструированию антимикробных пептидов, включая использование баз данных и методов машинного и глубокого обучения.

Наиболее объёмная **вторая глава** объединяет результаты многолетнего цикла исследований. Первая ее часть посвящена пространственной структуре кардиотоксинов (КТ) в водном растворе, получению и изучению рекомбинантного изотопно-меченного токсина, сравнению его с природным аналогом. Далее рассматриваются структурные изменения КТ при переходе в мембраноподобное окружение, моделирование их последовательного встраивания в липидный бислой, данные ЯМР- ^{31}P и взаимосвязь мембранной активности с антибактериальными и цитотоксическими эффектами. Итогом этого блока является предложенная автором классификация кардиотоксинов на восемь групп в зависимости от набора функционально значимых аминокислотных остатков в окончаниях трёх петель. Вторая часть этой главы посвящена линейным пептидам пауков — латарцинам, оксиопнину и их аналогам. Анализируются структура пептидов в воде и мембраноподобном окружении, влияние липидного состава, механизмы нарушения мембран и факторы, определяющие гемолитическую активность. На основании полученных закономерностей осуществляется рациональный дизайн более коротких аналогов с улучшенным соотношением антимикробной и гемолитической активности. Для ряда 20-членных производных оксиопнина показано сохранение широкого спектра антибактериальной активности, причем один из пептидов сочетал ее с минимальной гемолитической активностью.

Логическим завершением второй главы является переход от анализа отдельных природных пептидов к алгоритму поиска активных фрагментов. Создана библиотека фрагментов кардиотоксинов и линейных пептидов, применена обученная нейронная сеть, проведены синтез и экспериментальная проверка выбранных соединений и осуществлено их последующее структурно-функциональное исследование методами ЯМР. Автор выстраивает цикл «библиотека — вычислительный отбор — химический синтез — биологическое тестирование — структурный анализ — оптимизация».

Третья глава подробно описывает использованные экспериментальные методы. Представлены протоколы получения природных и рекомбинантных токсинов и синтетических пептидов, ЯМР высокого разрешения и ЯМР- ^{31}P , кругового дихроизма, конфокальной микроскопии, исследований целостности липосом, рентгеноструктурного анализа, полноатомной, грубозернистой и ускоренной молекулярной динамики, масс-спектрометрии, хроматографии и биологического тестирования.

Достоинством работы является её концептуальная целостность. Несмотря на то что диссертация обобщает исследования, выполнявшиеся на протяжении длительного периода, они не выглядят механически объединенным набором публикаций. Общей линией служит выяснение взаимосвязи «структура → взаимодействие с мембраной → биологический эффект → рациональный дизайн», что полностью соответствует названию работы «Мембраноактивные полипептидные токсины: взаимосвязь структура–функция».

Научная значимость и новизна работы

Научная значимость диссертации заключается прежде всего в формировании достаточно целостной молекулярной картины взаимодействия двух различных классов полипептидных токсинов с липидными мембранами. Полученные результаты существенно развивают представления о том, каким образом сравнительно небольшие изменения

аминокислотной последовательности и локальной структуры отдельных участков молекулы могут определять эффективность ее связывания с мембраной, глубину погружения в бислой и, в конечном счете, биологическую активность.

Среди наиболее значимых результатов следует выделить получение ^{13}C , ^{15}N -меченного рекомбинантного кардиотоксина и использование многомерной гетероядерной ЯМР-спектроскопии для детального исследования его структуры и динамики. Это позволило подтвердить и обобщить наличие для ряда КТ медленного конформационного равновесия, связанного с цис/транс-изомерией пептидной связи X-Pro8, и определить структурные особенности соответствующих конформеров. Одновременно сравнение природного и рекомбинантного токсинов показало, что дополнительный N-концевой остаток Met лишь умеренно изменяет структуру, но заметнее отражается на динамических свойствах и биологической активности.

Важным результатом является определение структур кардиотоксинов в мембраноподобном окружении и установление того, что с мицеллой связывается преимущественно транс-конформер. На основании экспериментальных и расчетных данных автор связывает неспособность цис-конформера эффективно встраиваться в мембрану с неблагоприятной организацией первой петли и экспонированием амидной группы, требующей энергетически невыгодной десольватации. Эта часть работы имеет существенное фундаментальное значение, поскольку связывает локальную конформационную динамику белка с его мембранной активностью.

Существенной новизной обладает сформулированная концепция функционально значимых, или «специальных», остатков Pro9, Ser28 и Asn/Asp45 в окончаниях трёх петель КТ и основанная на ней классификация токсинов на восемь групп. В предложенной модели мембранная активность определяется не просто общей гидрофобностью молекулы, а возможностью последовательного встраивания петель, причем первая петля играет ведущую роль, за ней следуют вторая и третья. На этой основе сформулирована так называемая маятниковая модель взаимодействия КТ с мембраной.

Отдельного внимания заслуживают исследования методами ^{31}P -ЯМР. Разработанный подход к анализу формы спектров мультиламеллярных липосом позволяет учитывать их деформацию в магнитном поле и оценивать влияние встроеного токсина на вязкоэластические свойства мембраны. На основании этих данных автор связывает разрушение бислоя с превышением критического содержания связанного токсина во внешнем монослое и формированием небислойных изотропных липидно-пептидных агрегатов. Таким образом, структурные данные ЯМР высокого разрешения дополнены независимой информацией о состоянии самой мембраны.

Значительную научную ценность имеют результаты по линейным токсинам пауков. Показано, что их структурное состояние существенно зависит от среды: в воде преобладают неупорядоченные конформации, тогда как при связывании с мембраной равновесие смещается в сторону амфифильных α -спиралей. Установлено, что мембранная активность зависит не только от суммарной гидрофобности и заряда, но и от конкретной организации гидрофобной поверхности спирали и состава липидной мембраны. Полученные результаты позволили связать повышенную гемолитическую активность ряда ЛП с особенностями гидрофобных кластеров, в частности с содержанием остатков Leu, и использовать эти закономерности при дизайне менее гемолитических аналогов.

Принципиально важным результатом представляется переход от структурного анализа природных токсинов к предсказательному дизайну. Создана библиотека примерно из 100 тысяч фрагментов КТ и ЛП длиной 9–22 аминокислотных остатка, разработана процедура отбора кандидатов с использованием нейронной сети и последующей обязательной экспериментальной проверки. Для фрагментов ЛП обнаружен структурный мотив, связанный с активностью против грамположительных бактерий, включая MRSA: N-

концевой гидрофобный якорь из не менее чем трех гидрофобных остатков и взаимодействие с фосфатидилглицерином.

Практическая значимость работы

Практическая значимость диссертации определяется прежде всего тем, что полученные фундаментальные закономерности непосредственно использованы для рационального конструирования новых антимикробных пептидов.

Предложен воспроизводимый многостадийный алгоритм поиска биоактивных фрагментов, включающий создание библиотеки последовательностей, формирование целевого обучающего набора, обучение нейронной сети, прогнозирование активности, химический синтез выбранных кандидатов, экспериментальное определение активности, ЯМР-анализ структуры и мембранного взаимодействия и последующую направленную оптимизацию. Важным достоинством является то, что вычислительное предсказание здесь не рассматривается как конечный результат, а встроено в экспериментальный цикл отбора и верификации.

При исследовании аналогов оксиопипина показана возможность уменьшения размеров исходных природных пептидов при сохранении антибактериальной активности и существенном снижении гемолитического действия. В частности, среди 20-членных аналогов были получены пептиды с активностью против *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*, причём один из них характеризовался минимальной гемолитической активностью. Эти результаты имеют непосредственное значение для оптимизации терапевтического индекса мембраноактивных АМП.

Практически значимым является также выявление структурного мотива селективности коротких anti-MRSA-пептидов. Для исследованных производных важными оказались N-концевой гидрофобный якорь и состояние C-концевой группы. Особенно интересен обнаруженный вариант гидрофобного якоря FWF, для которого в исследованной серии не выявлена гемолитическая активность. Эти результаты могут служить отправной точкой для дальнейшей химической оптимизации соединений.

Предложенная классификация кардиотоксинов также имеет потенциальную прикладную ценность, поскольку дает возможность рационально выбирать представителей этого семейства с различной выраженностью мембранного и цитотоксического действия, не ограничиваясь эмпирическим скринингом большого числа природных токсинов. Наконец, практическое значение имеют разработанные или адаптированные в работе методические подходы — получение изотопно-меченных КТ, использование гетероядерной ЯМР на естественном содержании ^{13}C и ^{15}N для небольших пептидов, анализ спектров ЯМР- ^{31}P деформируемых липосом и объединение этих методов с молекулярной динамикой. Такие подходы могут быть использованы значительно шире конкретных объектов данной диссертации.

Достоверность результатов

Достоверность представленных в диссертации результатов представляется высокой и обеспечивается прежде всего использованием широкого комплекса взаимодополняющих экспериментальных и расчетных методов. Ключевые выводы, как правило, не строятся на данных одного метода: структурная информация ЯМР сопоставляется с поведением токсинов и пептидов в липосомах, биологической активностью, результатами молекулярной динамики, а в отдельных случаях — с рентгеноструктурными данными.

Особенно убедительной является методическая база структурных исследований. ЯМР-эксперименты проводились на спектрометрах Bruker с рабочими частотами по протонам 600, 700 и 800 МГц, включая использование четырехканальных криогенных датчиков. Надежность идентификации исследуемых соединений обеспечивалась многостадийной хроматографической очисткой, масс-спектрометрическим контролем

природных токсинов и синтетических пептидов; для химически синтезированных соединений указана чистота не ниже 95%. При рентгеноструктурных исследованиях использовались современные синхротронные источники SPring-8 и PETRA III, а обработка дифракционных данных выполнялась стандартными специализированными программами XDS, Aimless и CCP4. Существенно, что часть структурных выводов, первоначально сделанных на основании ЯМР и молекулярного моделирования, сопоставляется с независимыми результатами РСА.

Следует положительно оценить экспериментальную проверку вычислительных предсказаний. Результаты нейросетевого отбора не принимаются автором априори: предсказанные соединения синтезируются и тестируются, причем в диссертации подробно обсуждаются и случаи существенного расхождения предсказанной и реальной активности. Например, отмечена сильная зависимость активности от конкретного бактериального штамма и показано, что алгоритмы, обученные на обезличенных данных по виду микроорганизма, могут давать заметные ошибки. Это, на мой взгляд, существенно повышает доверие к работе, поскольку демонстрирует критическое отношение автора к собственным расчетным моделям.

Дополнительным подтверждением достоверности является широкая апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 32 статьи, включая 7 обзоров, в российских и зарубежных рецензируемых журналах; результаты также представлены в 36 тезисах российских и международных конференций.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Он составлен в соответствии с общепринятой структурой. В нем представлены результаты проведенных исследований, ключевые выводы работы, а также список публикаций по теме диссертации.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Несмотря на несомненные достоинства диссертационной работы, большой объем выполненных исследований и значимость полученных результатов, при ее рассмотрении возникает ряд вопросов и замечаний, преимущественно дискуссионного и редакционного характера.

1. Насколько универсальной можно считать предложенную классификацию кардиотоксинов на восемь групп?

Одним из центральных результатов диссертации является классификация КТ, основанная на присутствии или отсутствии трех «специальных» аминокислотных остатков (Pro9, Ser28 и Asn/Asp45) и предполагающая закономерное увеличение мембранной активности с ростом номера группы. В работе эта схема рассматривается не только как структурная классификация, но и как потенциальный инструмент предсказания биологической (прежде всего цитотоксической) активности. При этом экспериментальная проверка связи этой классификации с цитотоксичностью выполнена для ограниченного набора токсинов и клеточных моделей.

2. Ряд положений, представленных в итоговых выводах как установленные закономерности, фактически имеет характер рабочей гипотезы.

Это относится, в частности, к эволюционной интерпретации происхождения «специальных» остатков и их предполагаемой связи с взаимодействием КТ с фосфолипазой A2. В тексте заключения автор прямо пишет: «мы выдвинули следующую гипотезу», а последующие рассуждения сопровождаются словами «вероятно». Вместе с тем в седьмом итоговом выводе уже достаточно категорично утверждается, что КТ из групп с меньшим номером формируют комплекс с фосфолипазой A2 и действуют синергически, тогда как КТ из групп с большим номером действуют самостоятельно. Было бы корректнее сохранить в итоговых выводах тот уровень осторожности, который присутствует в обсуждении.

3. Требуется дополнительное обсуждение степени связи между модельными мембранными системами и биологическими мембранами.

Значительная часть механистических выводов сделана на основании данных, полученных в мицеллах DPC или LPPG, мультислойных липосомах и модельных фосфолипидных бислоях. Это общепринятые и информативные системы, и важным достоинством диссертации является использование нескольких различных мембранных моделей. Однако реальные мембраны отличаются гораздо более сложным липидным составом, наличием холестерина, белков, углеводных компонентов, асимметрией монослоев и мембранным потенциалом. Сам автор показывает, что даже сравнительно небольшое изменение фосфолипидного состава может существенно изменять поведение линейных пептидов. Например, для латарцина I мембранный эффект заметно зависит от присутствия фосфатидилэтаноламина. Было бы полезно обозначить границы применимости «маятниковой» модели при переносе результатов с модельных систем на клеточные мембраны.

4. Практическая значимость некоторых результатов сформулирована несколько более широко, чем позволяют представленные экспериментальные данные.

В работе говорится о перспективах внедрения полученных пептидов «в практику лечения антибиотико-резистентных инфекций и химиотерапию ряда новообразований». Однако представленные исследования относятся преимущественно к уровню *in vitro*, модельным мембранам и отдельным клеточным или бактериальным системам. Для оценки реальной фармакологической перспективности потребуются исследования стабильности в биологических средах, фармакокинетики, иммуногенности, системной токсичности, эффективности *in vivo*, а также значительно более широкое изучение селективности. Поэтому уместнее говорить о создании научной основы или молекулярных прототипов для дальнейшей разработки, чем о непосредственном приближении к клиническому применению.

5. В диссертации имеются неточности, грамматические ошибки, опечатки и неудачные синтаксические конструкции.

Так, в заключении приводятся ссылки на «раздел 4.1.1», «4.1.2», «4.2.1» и т.п., тогда как собственные результаты представлены в главе 2, а соответствующие подразделы имеют номера 2.1.1, 2.1.2, 2.2.1 и т.д. В работе параллельно встречаются обозначения ЛП (линейные пептиды), ЛМАП (линейные мембрано-активные полипептиды) и МАТ (мембраноактивные токсины). В отдельных местах линейные пептиды ошибочно обозначены как «ЛТ». Было бы желательно выбрать одно основное обозначение для каждого класса объектов и последовательно придерживаться его. Встречаются фразы с ошибками, например, «ТПТ, не имеющими белковой мишени, являются цитотоксины», «они неспецифически взаимодействуют», «токсичность яда объясняется», «все ТПТ обладает» и т.п.

Перечисленные выше вопросы и замечания не затрагивают достоверности основных экспериментальных результатов и не снижают общей высокой оценки диссертационной работы.

Заключение

По актуальности выбранной темы, научной новизне проведенного исследования, теоретической и практической значимости полученных результатов, достоверности и обоснованности сформулированных выводов диссертационная работа Дубовского Петра Викторовича «Мембраноактивные полипептидные токсины: взаимосвязь `структура-функция» полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении учёных степеней» (утверждённым 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; 26.01.2023 г. №101), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени доктора химических наук по специальности 1.4.9 «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник, руководитель межкафедральной лаборатории магнитной томографии и спектроскопии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, доктор химических наук по специальности 1.5.4. «Биохимия».

Польшаков Владимир Иванович



Контактные данные:

Тел: +7-916-165-3928

Адрес электронной почты: polshakovvi@my.msu.ru

Адрес места работы: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, Химический факультет

Подпись д.х.н. Польшакова В.И. удостоверена
И.о. Декана Химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
Профессор РАН, д.х.н.



М.П.



Карлов С.С.

» 10 2026 г.