

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Шараповой Яны Александровны**  
**на тему: «Поиск новых путей регуляции функциональных свойств**  
**нейраминидазы NanA как ключевого фермента патогенеза *Streptococcus***  
***pneumoniae* с использованием методов компьютерной биологии»**  
**по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»**

Диссертация Шараповой Я.А. посвящена изучению структурных и функциональных особенностей нейраминидазы А (NanA) из *Streptococcus pneumoniae*, и поиску новых путей регуляции ее функции. NanA является одним из ключевых ферментов, обеспечивающих адгезию, питание и рост этой болезнетворной бактерии, а также способствующих образованию биопленки. Также NanA является гомологом хорошо известной нейраминидазы вируса гриппа. Совместное инфицирование человека вирусом гриппа и пневмококком может привести к опасным осложнениям. По этим причинам нейраминидазы обоих патогенов считаются перспективными мишенями для действия лекарств. Приведенный автором подробный обзор литературных источников по теме показывает, что, несмотря на важность объекта исследования, очень многое о нем остается неизвестным – например, не расшифрована полная структура фермента, неясны конкретные механизмы его участия в патогенезе. Исходя из вышесказанного, актуальность темы диссертации не вызывает сомнений.

Диссертация построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, основных результатов и выводов, а также списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 160 страницах, содержит 44 иллюстрации и цитирует 261 литературный источник.

В обзоре литературы приводится информация о суперсемействе сиалидаз, включая ферменты микроорганизмов и вирусов. Особое внимание уделено нейраминидазам вируса гриппа и пневмококка, имеющейся информации о структуре и механизму действия, обсуждению вопросов о перспективности нейраминидаз как мишеней для создания лекарств от заболеваний дыхательных путей человека, а также современному состоянию исследований и доступным лекарственным препаратам.

Применяемые в работе методы и материалы изложены в соответствующем разделе на 30 страницах. В тексте детально описаны подходы биоинформатики, используемые для сбора первичной информации, поиска гомологов, построения структурно-опосредованных множественных выравниваний нейраминидаз из различных источников, сравнительного анализа аминокислотных последовательностей и 3D-структур. Также, подробно описаны применяемые в ходе работы программы и

параметры запуска для решения задач молекулярного моделирования: подготовки полноатомных молекулярных моделей белков, лигандов, фермент-субстратных комплексов, проведения расчетов молекулярной динамики и молекулярного докинга. Особое внимание в этом разделе посвящено моделированию полноразмерной структуры нейраминидазы А из *Streptococcus pneumoniae*, включая подготовку исходных данных с использованием биоинформатического анализа и белок-белкового докинга, а также моделированию межмолекулярной агрегации фермента и его взаимодействия с известными низкомолекулярными лигандами.

В разделе «Результаты и их обсуждение» подробно разбираются основные результаты проведенных исследований. Описание начинается с сравнения объектов исследования с известными структурами других сиалидаз. Впервые автором показано, что нейраминидаза А коренным образом от них отличается, представляя собой модульный фермент с доменами, соединенными подвижным, гибким участком полипептидной цепи, и благодаря этой гибкости две ее молекулы NanA способны образовать стабильный межмолекулярный комплекс. Возможность образовывать комплексы двух каталитических или каталитического и лектинового доменов была продемонстрирована при помощи проведения белок-белкового докинга и изучения стабильности найденных конформаций при помощи длительных расчетов молекулярной динамики. Установленная редкая для сиалидаз структурная организация нейраминидазы А из *Streptococcus pneumoniae* и способность образовать межмолекулярные агрегаты, как в дальнейшем показано Шараповой Я.А., может обеспечить важную функциональную роль этого фермента в патогенезе, благодаря участию NanA в формировании биопленки. На следующих этапах диссертационной работы автором были обнаружены и проанализированы два новых аллостерических центра в структуре нейраминидазы А. Один из них находится в интерфейсе взаимодействия двух молекул NanA, и именно в нем, согласно результатам исследования, связывается артокарпин – экспериментально подтвержденный ингибитор каталитической функции NanA и образования биопленок. Другой аллостерический центр расположен с противоположной от активного центра стороны белковой глобулы и способен связывать сахара, входящие в состав олигосахаридных рецепторов эпителия дыхательных путей. Соискатель высказала предположение, что этот аллостерический центр может способствовать адгезии бактерий. В завершающей части диссертационной работы автором были проанализированы каталитические центры вирусных и бактериальных нейраминидаз из различных организмов. Шараповой Я.А. было выявлено, что ключевые каталитические остатки, консервативные в нейраминидазах из бактерий и вирусов, можно использовать при создании ингибиторов двойного действия, подавляющих активность тех и других. При этом такие ингибиторы не должны конфликтовать со специфическими остатками,



отличающимися у нейраминидаз из различных источников и обуславливающими селективность каждого центра.

По результатам исследования автор предлагает три способа регуляции функциональной активности NanA из *Streptococcus pneumoniae*: ингибиторами межмолекулярной агрегации NanA и образования биопленки, ингибиторами бактериальной адгезии и ингибиторами двойного действия, подавляющими активность и бактериального, и вирусного ферментов. Вынесенные на защиту положения соответствуют цели работы и поставленным задачам.

По материалам диссертации Шараповой Я.А. опубликованы 4 статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus, в том числе, 2 статьи в журнале квартили Q1. Полученные результаты были представлены на 44-ом конгрессе FEBS (Краков, Польша, 2019), международной конференции «Moscow Conference on Computational Molecular Biology» в 2017 и 2019 гг., международной конференции «Суперкомпьютерные дни в России «RuSCDays'19» Положительно оценивая работу в целом, можно отметить следующие замечания:

1. В разделе 4, посвященном описанию методов, приводится некоторый анализ результатов и даже выводы. Например:

стр. 63. *“Основной вывод, который можно сделать из всех МД-симуляций сиалидаз – в контексте данного исследования результат не зависел от выбора силового поля, т.к. все модели NanA, построенные по гомологии, в конечном итоге разделились на лектиновый и каталитический домены, связанные междоменным линкером, в то время как все модели NanB, NanC, транс-сиалидазы из M. decora, сиалидаз из T. rangeli, T. cruzi и V. cholerae сохраняли компактную глобулярную структуру на протяжении всей МД-траектории.”*

стр. 64 *“Графики плотности, температуры и общей энергии сошлись к концу периода эквilibрации.”*

Было бы более логичным привести в разделе “Методы” основные, применяемые в ходе работы подходы, протоколы и параметры исследований, а результаты и их обсуждение вынести в раздел 5 “РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ”

2. При параметризации моделей лигандов (раздел 4.3.1.1) автор использует разные программы проведения квантово-механических расчетов для оптимизации и расчетов зарядов оптактина и артокарпина- пакеты Firefly и Gaussian, соответственно. В тексте не приводятся объяснения, с чем это было связано. Также, в разделе не приводятся основные параметры соответствующих квантово-механических расчетов, которые позволили бы повторить, или проверить рациональность их использования.

3. В разделе 4.3.2.3., стр. 65 указывается, что для проведения молекулярно-динамические симуляций использовался ансамбль NVT при температуре 300 К. Для описания реалистичных условий в ходе расчетов молекулярной динамики, в зависимости от решаемых задач, чаще всего применяются NPT или NVE ансамбли. К сожалению, в тексте автор не приводит объяснения применения именно NVT ансамбля для своих исследований.

4. При оформлении составных рисунков в тексте диссертационной работы Яна Александровна использует как английские, так и русские буквы (Рисунок 5А,Б или Рисунок 11А,В,С.). Помимо этого, встречаются рисунки, на которых соответствующие отметки отсутствуют, но они есть в описании. Например, Рис. 37, 39

5. В разделе 5.2.2. приводятся результаты исследования связывания оптактина в аллостерических сайтах NanB и NanA с использованием расчетов молекулярной динамики. В качестве обоснования стабильности связывания лиганда с NanB приводится график значений RMSD (Рис. 37 А), рассчитанных на траектории 10нс, а NanA- 30нс. Проанализировав эти графики видно, что лиганд в NanA связан менее стабильно и в первые 10нс. смещается на 3-4Å. Основное смещение наблюдается после 13-15нс. динамики. При этом, из приведенных значений невозможно сравнить “поведение” оптактина в сайте NanB после 10нс. Если на рисунках приведена лишь часть динамики комплексов, то автору следовало бы представить значения RMSD для лиганда в комплексе с NanB как минимум до тех же 30нс. Также, для понимания смещения лиганда в аллостерическом сайте NanA было бы более наглядно привести иллюстрацию трехмерной структуры аллостерического сайта с наложением конформации оптактина “до” и “после” симуляции МД.

6. В разделе 5.3.2. приводятся результаты исследования возможности связывания известных ингибиторов вирусных нейраминидаз с NanA *S. pneumoniae* при помощи методов молекулярного докинга. Результаты этой работы представлены в виде иллюстраций структур найденных конформаций (Рис. 44) лигандов в активном центре нейраминидазы вируса H1N1 и NanA, а также общими словами о “воспроизводимости” конформаций соединений, представленных в кристаллических структурах комплексов в результате проведения докинга. Для большей наглядности автору следовало бы привести значения оценочной функции докинга, которые можно было бы сопоставить с соответствующими значениями IC50, представленными для вирусных и бактериальных ферментов. Приведенные в данной главе результаты не являются ключевыми в диссертационной работе Шараповой Я.А., в связи с чем, было бы более логично описать их ранее в тексте, а не ставить в качестве завершающих.



Указанные выше замечания не снижают ценности и значимости проведенного диссертационного исследования. Диссертация отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08 «Биоинженерия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Считаю, что соискатель Шарапова Яна Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 «Биоинженерия».

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института трансляционной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российского Национального Исследовательского Медицинского Университета имени Н.И. Пирогова»

ЩЕРБИНИН Дмитрий Сергеевич

20 августа 2021 г.

Контактные данные:

тел. +7(995)881-2012, e-mail: D.Shcherbinin\_Polytech@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
03.01.09 – «Математическая биология, биоинформатика»

Адрес места работы:

117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1, стр. 9

Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова, Институт трансляционной медицины  
тел. +7(499)742-81-22, e-mail: rsmu@rsmu.ru

Подпись сотрудника

РНИМУ имени Н.И. Пирогова

Д.С. Щербинина удостоверяю:

