

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Столярской Марии Ярославовны

«Биоинформатические исследования α -, β - и γ -карбоангидраз как перспективных терапевтических мишеней» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

1.5.3. - молекулярная биология

Ферменты карбоангидразы давно исследуются как ключевые регуляторы бикарбонатной буферной системы. Работами последних десятилетий показано, что представители этого семейства обнаруживаются во всех доменах жизни, являются ключевыми звеньями в патогенезе глаукомы, эпилепсии, ожирения и опухолевого роста у человека, а также в адаптации патогенных бактерий к условиям организма хозяина. Отсюда обусловлен интерес к карбоангидразам как терапевтическим мишеням, и потребность в ингибиторах избирательного действия, что делает диссертационную работу М.Я. Столярской актуальной как для молекулярной биологии, так и для медицинской химии. В направленном синтезе таких соединений ключевая трудность состоит в понимании причин избирательного действия. Пятнадцать изоформ α -класса человека обладают высокой гомологией и сходной архитектурой активного центра, и долгое время оставалось неясным, какое именно соединение обеспечит избирательность и на что ориентироваться при его дизайне. Столь же трудно перенести накопленный для α -класса опыт на β - и γ -карбоангидразы бактерий, устроенные принципиально иначе. Работа М.Я. Столярской обращена именно к этим вопросам, и предлагает их решение со стороны структурной биологии.

В качестве лигандов автором использованы соединения 8V8 и 8V5, для которых ранее были установлены сверхвысокие значения констант ингибирования. Попытка объяснить механизм связывания этих ингибиторов с активным центром α -карбоангидразы была предпринята в 2017 году на основе кристаллических структур комплексов, но вопрос остался без ответа. Как указывает автор, причин тому несколько: не решена электронная плотность для хвостовой части лиганда 8V5, а анализ комплексов не выходил за пределы рутинного описания известных позиций связывания консервативных фрагментов соединений, тогда как требовалось рассмотрение всей структуры комплекса и сравнение с апо-формой фермента. Одним из результатов диссертационной работы стало то, что впервые решена задача по определению электронной плотности для морфолинового фрагмента. Это позволило описать ранее неизвестные контакты: бифуркационную водородную связь с Gln92 и взаимодействие морфолинового фрагмента с Phe131. Последнее наблюдение имеет прямое значение для практики. Остаток Phe131 специфичен для α -CA II, тогда как в соответствующем положении изоформ IX и XII находятся валин и

аланин, и утрата крупной боковой группы в этой позиции сопровождается изменением констант ингибирования приблизительно на три порядка. Появляется, таким образом, конкретное основание для дизайна структур новых ингибиторов СА. Столь же существенным представляется вывод о роли стерической комплементарности. Избирательность ингибитора принято связывать с подбором функциональных групп в хвостовой части молекулы, тогда как автором показано, что решающий вклад вносит соответствие всей молекулы лиганда геометрии полости активного центра, то есть принцип «ключ–замок». В этом я вижу новизну работы и её вклад в развитие подходов к дизайну ингибиторов карбоангидраз.

Особого упоминания заслуживает та часть работы, которая посвящена β -карбоангидразе mtCA2 *Mycobacterium tuberculosis*. Предложенная около двадцати лет назад модель рН-зависимой активации, связывающая конформацию активного центра с переходом фермента между димерной и тетрамерной формами, была без прямой проверки распространена на β -карбоангидразы иных организмов и утвердилась в литературе как общепринятая. Автор обратилась к истокам этой гипотезы. При её формулировании в 2006 году вопрос ставился как альтернатива: зависит конформация активного центра от олигомерного состояния фермента или не зависит. Имевшиеся экспериментальные данные склоняли ко второму ответу, однако прямой проверки они не давали, а для неё требовался хотя бы расчётный подход. В настоящей работе такой расчёт проведён методом молекулярной динамики на четырёх модельных системах в независимых повторах суммарной длительностью 3,6 мкс. Обе конформации активного центра, открытая и закрытая, сохраняли устойчивость как в димере, так и в тетрамере на протяжении всей симуляции. Устойчивость обеих конформаций указывает на более сложную механику работы фермента, нежели предполагала исходная модель, и ведёт к вполне практическому следствию. Альтернативным сайтом связывания может служить сам активный центр в закрытой конформации, где координационную позицию цинка занимает Asp53. Такой сайт связывания не требует координации с металлом и не имеет аналогов среди изоформ человека, что снимается вопрос о кросс-таргетном действии ингибитора. Тем самым открывается путь к ингибиторам принципиально иного химического типа, свободным от сульфонамидной группы.

Наконец, для γ -карбоангидраз автором рассматривается ещё один случай, требующий пересмотра установившихся представлений. Долгое время для *E. coli* была известна лишь одна γ -карбоангидраза, не проявляющая каталитической активности. В 2020 году появились сведения о второй каталитически активной изоформе EсoCA γ , отличающейся от

первой наличием N-концевого домена. Оставалось, однако, неясным, какую функцию этот домен выполняет и у каких штаммов встречается. Проведенный в данной работе BLAST-анализ показал, что укороченный вариант встречается преимущественно у лабораторных штаммов, тогда как полноразмерный фермент широко представлен у представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Для N-концевого домена в работе предложена гипотеза якорной функции, проверенная затем расчётными методами. И аминокислотный состав N-концевого домена, и данные расчётов указывают на то, что каталитически активная изоформа с наибольшей вероятностью является мембранной. Автор также обращает внимание и на то, что опубликованные данные о высокой активности EсoCA_γ получены на конструкции с дополнительным водорастворимым пептидом на N-конце, который вполне мог экранировать гидрофобный домен, что заставляет отнестись к прежним данным с осторожностью. Так, результаты работы меняют представление о локализации EсoCA_γ в клетке и вместе с этим подход к дизайну ингибиторов.

Подводя итог, следует подчеркнуть, что полученные автором результаты вносят существенный вклад в понимание структурно-функциональных особенностей карбоангидраз различных классов и создают основу для рационального дизайна селективных ингибиторов СА.

Методологическая грамотность работы не вызывает сомнений. Сочетание экспериментальных подходов, включающих получение и очистку препарата белка, сокристаллизацию с лигандами и рентгеноструктурный анализ, с биоинформатическим анализом и молекулярно-динамическими расчётами позволило автору провести всестороннюю и оценку полученных данных. Там, где выводы делаются на расчётной основе, они подкреплены независимыми повторами симуляций и согласованными предсказаниями нескольких алгоритмов, что не оставляет сомнений в достоверности полученных данных. Выводы соответствуют полученным результатам. Результаты исследования опубликованы в трёх статьях в рецензируемых научных журналах высокого уровня, индексируемых в Web of Science и Scopus, причём во всех трёх соискатель является первым автором, что свидетельствует о самостоятельном характере выполненного исследования и о личном вкладе автора в полученные результаты. Материалы работы в полной мере доложены на российских и международных конференциях.

Автореферат диссертации написан ясно, логически выстроен, хорошо проиллюстрирован и полностью отражает содержание диссертации. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, а именно пунктам 1, 9 и 15 области исследований, поскольку работа посвящена изучению структурной организации и

Диссертационная работа соответствует требованиям Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 «О порядке присуждения учёных степеней» (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Столярская Мария Ярославовна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.



e-mail : a.shetnev@list.ru

Я, Шетнев Антон Андреевич, даю согласие на включение и дальнейшую обработку своих персональных данных при подготовке документов аттестационного дела соискателя учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология Столярской Марии Ярославовны.

«10» Октября 2026 г.

Начальник управления по кадровому
и организационному обеспечению

Галерея

