

ОТЗЫВ

научного консультанта

на диссертацию ГИЛЕПА Андрея Александровича

«Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Диссертационная работа к.х.н. Гилепа Андрея Александровича выполнялась в рамках плановых исследований Института биоорганической химии НАН Беларуси по разработке подходов к получению мембран-связанных гемопротейнов, включая цитохромы P450 человека и патогенных микроорганизмов, выявления структурно-функциональных взаимосвязей и закономерностей определяющих регуляцию процессов биосинтеза стероидов и создание на их основе подходов необходимых для лечения пациентов.

Решению комплекса этих задач и посвящена диссертационная работа соискателя и ему удалось в этой работе разработать комплексный подход исследования стероидгидроксилазных систем.

К несомненным достижениям соискателя следует отнести структурно-функциональные и интреактомные исследования стероидгидроксилаз. В рамках данного направления работ были выведены следующие закономерности:

- Установлены особенности молекулярной эволюции CYP17 и CYP51.
- Впервые установлено участие стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов на уровне изолированных ферментов в каталитическом превращении дельта-7 стероидов.
- Установлено, что белки группы PGRMC относятся к гемопротейнам.
- Установлены кинетические и термодинамические параметры взаимодействия стероид-гидроксилаз с белками партнерами.

Следующий этап работы соискателя связан с изучением ферментов биосинтеза и метаболизма стероидов патогенных организмов: патогенных грибов и *Mycobacterium tuberculosis*. В рамках данного направления работ впервые было установлено участие монооксигеназ и стероиддегидрогеназы *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов; получены новые данные о значимости отдельных аминокислотных замес CYP51 патогенных грибов в развитии резистентности патогенных грибов к действию азол-содержащих противогрибковых средств; установлены потенциальные модуляторы активности стероид-гидроксилаз из числа производных стероидов, азолов и полифенолов, а также олигонуклеотидных аптамеров.

Производит впечатление и объем выполненных исследований в данной работе. Несомненно, разработанные подходы и полученные данные будут

востребованы в области получения и структурно-функционального анализа малоизученных и орфанных мембраносвязанных гемопротеинов; биоинформатики; медицинской химии в области дизайна новых лекарств.

Гилеп А.А. - квалифицированный специалист, сформировавшийся ученый, владеющий хорошими экспериментальными навыками, отлично ориентирующийся в научной литературе, способный формулировать и решать сложные научные задачи. Гилеп А.А. активно участвует в подготовке научных кадров в РБ: под его руководством защищено 5 кандидатских диссертаций; проводится подготовка студентов, магистрантов и аспирантов; прочитан курс «Структурная биологии» для магистрантов специальности «Биоинформатика» биологического факультета БГУ; прочитан курс «Получение рекомбинантных белков, моноклональных терапевтических антител и вакцин» для студентов биологического факультета БГУ.

Под его руководством выполняются научно-исследовательские и прикладные работы в сотрудничестве с различных подразделениями института, рядом других научных и образовательных организаций Беларуси, университетов и международных исследовательских центров. Результатом такого сотрудничества стало значительное число публикаций (более 50), не отраженных в данной диссертационной работе, но однозначно высоко характеризующих соискателя как востребованного и высококвалифицированного ученого.

Считаю, что выполненная в области структурно-функционального анализа фармацевтически-значимых белков диссертационная работа «Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз» содержит принципиально новые результаты и открытия, совокупность которых является крупным достижением в органической химии, соответствует требованиям ВАК Республик Беларусь, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – ГИЛЕП АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ заслуживает присуждения ему искомой ученой степени по специальности 03.01.04 – «биохимия» за следующие научно обоснованные результаты, включающие:

- Установление избирательности типа катализируемых реакций в зависимости от формы СYP17 с использованием молекулярного клонирования СYP17 из различных организмов, получения высокоочищенных препаратов данных ферментов и определение их лигандсвязывающих и каталитических свойств, что в совокупности необходимо для понимания патогенеза онкологических и эндокринных заболеваний и разработки новых систем диагностики.

- Установление каталитического превращения 5,7-диен-стероидов и секостероидов ферментами биосинтеза стероидных гормонов - СYP11A1 и СYP17A1

с использованием *in vitro* реконструкции и методов идентификации образующихся производных стероидов, что необходимо для понимания патогенеза недостаточности 7-дегидрохолестерин редуктазы, участия 5,7-диен стероидов в метаболических процессах в организме человека, установления новых природных производных секостероидов, а также для создания эффективной системы реконструкции ферментативных реакций, катализируемых CYP11A1 и CYP17A1, с использованием в качестве субстратов 3 β -гидроксигидрокси-5-ен-стероидов.

- Установление закономерностей молекулярной эволюции клинически-значимых стероид-гидроксилаз, факта специфического взаимодействия и параметров взаимодействия производных стероидов и противогрибковых азол-содержащих соединений с активным центром стероид-гидроксилаз, а также обнаружение факта специфического взаимодействия сконструированных олигонуклеотидных аптамеров и лютеолин-7,3'-дисульфата с поверхностью стероид-гидроксилаз с использованием методов спектрофотометрического титрования, биосенсорного анализа и *in vitro* реконструкции ферментативных систем, что позволяет обосновать клиническую значимость отдельных аминокислотных замен в развитии резистентности патогенных грибов, а также использовать данные группы соединений для создания нового поколения высокоспецифичных модуляторов активности стероид-гидроксилаз.

- Определение параметров белок-белковых взаимодействий стероид-гидроксилаз с редокс-партнерами митохондриального и микросомального типа с использованием биосенсорного анализа, анализа одноэлектронного переноса в системах и *in vitro* реконструкции ферментативных систем, что позволило предложить молекулярные механизмы переноса электронов и специфичности белок-белковых взаимодействий в CYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах.

- Установление молекулярных основ действия цитохромов *b*₅ и PGRMC на стероид-гидроксилазы, с использованием расчета кинетических и термодинамических параметров белок-белковых взаимодействий стероид-гидроксилаз с модуляторами активности методом биосенсорного анализа, что позволило выявить особенности молекулярных механизмов аллостерической регуляции в CYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах и обосновать клиническую значимость отдельных аминокислотных замен в белках партнерах.

- Открытие участия ферментов *M.tuberculosis* в метаболизме иммуно-активных стероидов с использованием методов бионформационного анализа, спектрофотометрического титрования, *in vitro* реконструкции ферментативных систем, подходов по созданию ингибиторов ферментов, структурного анализа и анализа метаболизма иммуноактивного стероида клетками

M.tuberculosis, что в совокупности важно для понимания толерантности микобактерий к действию иммунной системы человека, а также представляет практический интерес для разработки инновационных терапевтических подходов для лечения пациентов с микобактериозами.

Научный консультант
член корреспондент НАН Беларуси,
д.х.н., профессор,
главный научный сотрудник
ИБОХ НАН Беларуси

С.А. Усанов

