

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Мариной Валерии Ивановны
на тему: «Новые аспекты действия антибиотиков, связывающихся с 50S
субъединицей рибосом»
по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Диссертационная работа Мариной Валерии Ивановны посвящена неисчерпаемой теме поиска новых антибиотиков и исследования механизма их действия. **Актуальность темы** определяется развитием устойчивости бактерий к применяемым на практике лекарственным средствам и существенным затруднениям при борьбе с бактериальными инфекциями, вызываемыми устойчивыми бактериями. В поиске новых лекарственных средств важное место занимает скорость и точность определения минимальной ингибирующей концентрации химического соединения, токсичности к организму человека и возможным побочным эффектам, перечню бактерий, чувствительных к антибиотику, а также крайне желательно понять его механизм действия. Обширный круг антибиотиков действует на систему биосинтеза белка, а именно, связывается с бактериальной рибосомой и подавляет один из этапов трансляции. Однако, из-за накопления мутаций в рибосомных белках и рРНК, эффективность действия антибиотиков может значительно снижаться или даже полностью прекращаться.

Цель работы Валерии Ивановны заключается в исследовании механизма действия двух природных антибиотиков: цистоцина и терморубина. В результате исследований было показано, что цистоцин, подобно пуромицину, аналогом которого он является, способствует абортированию трансляции за счет переноса на себя растущей полипептидной цепочки, а терморубин ингибирует стадии элонгации и/или терминации трансляции, не оказывая прямого ингибирующего воздействия на инициацию трансляции. На мой взгляд, наиболее актуальным и практически интересным результатом стала

разработка новой BODIPY-системы для мониторинга процесса трансляции *in vitro*. Она нацелена на быстрое, простое и достоверное определение влияния исследуемых соединений на биосинтез белка. Более того, BODIPY-система трансляции позволяет анализировать влияние антибиотиков на инициацию, элонгацию и терминацию трансляции, и дискриминировать их действие на отдельные этапы биосинтеза белка. Все исследования проведены диссертантом впервые, указанные ключевые результаты составляют **научную новизну работы**.

Диссертационная работа Мариной Валерии Ивановны составлена по классической схеме из трех частей: обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение.

Обзор литературы посвящен методам исследования ингибиторов биосинтеза белка в прокариотических клетках. Он охватывает как *in vitro* методы, так и частично *in vivo*. В начале обзора приведены краткое описание стадий трансляции на бактериальных рибосомах, затем перечислены преимущества и особенности основных методов исследования биосинтеза белка. Существенное внимание уделяется кинетическим методам исследования, которые позволяют наиболее динамично оценивать происходящие этапы трансляции на рибосомах. Дана систематизированная информация по применяемым для исследований трансляции флуоресцентным меткам. Особое внимание уделено BODIPY меткам, их разновидностям и примерам использования в лабораторных исследованиях, в том числе, биомедицинских. Обзор литературы хорошо проиллюстрирован, имеет большое число ссылок на оригинальную научную литературу, и производит хорошее впечатление.

Раздел «**Материалы и методы**» содержит исчерпывающее описание используемых реактивов, бактериальных штаммов, инструментальных средств, основных методов исследования. Однако, лично мне не хватило условий постановки электрофорезов для анализа длины синтезированных полипептидов в разработанной диссертантом BODIPY-системе. Хотя состав

ряда буферных растворов и носителей указан в разделе «3. Буферы и растворы», не приводятся условия проведения электрофореза и нет указания, какие конкретно растворы применялись в каждом случае. С другой стороны, подробно описаны условия детекции флуоресцентно-меченых пептидов на получаемых гелях, что несколько нивелирует это замечание.

Раздел «**Результаты и обсуждение**» очень подробно описывает полученные данные, возникающие в ходе работы диссертанта проблемы и пути их решения. Результаты работы представлены подробно, хорошо иллюстрированы, достоверно изложены. Анализ результатов проведен статистически достоверно, критически и полно. Подробно описаны особенности применения разработанной диссертантом BODIPY-системы для исследования ингибиторов трансляции с её тестированием на основе известных по механизму действия антибиотиков. Система была успешно применена для анализа работы двух описываемых в работе антибиотиков.

Влияние цистоцина на биосинтез белка исследован несколькими современными методами, включая двойную репортерную систему DualRep2, определение минимальной ингибирующей концентрации на целом ряде бактериальных штаммов, сравнение влияния пурамицина и цистоцина на трансляцию в прокариотической и эукариотической системах *in vitro*, toe-print анализ, и, конечно, оценку механизма действия с использованием BODIPY-системы. Все эксперименты были проведены в сравнении с действием пурамицина, сходного по структуре с исследуемым цистоцином. Впервые показано, что антибиотик цистостин действует так же, как его структурный аналог пурамицин, а именно останавливает пептидилтрансферазную реакцию, акцептируя на себя растущую цепочку пептида с образованием пептидил-цистоцина.

Уточнен механизм действия антибиотика терморубина на трансляцию. Для этого проведен комплексный анализ функционирования бактериальных рибосом *in vitro* в его присутствии, определена МИК для разных штаммов *E. coli*. В сотрудничестве с коллегами из лаборатории А. Л. Коневеги в ходе *in*

in vitro экспериментов были получены кинетические данные, свидетельствующие о том, что терморубин влияет на элонгацию и/или терминацию трансляции. Более того, в сотрудничестве с коллегами из лабораторий М. Г. Гагнона и Ю. С. Поликанова получены структуры рибосомы *Thermus thermophilus* с антибиотиком, а также с тРНК в А- и Р-сайтах, что позволило провести анализ взаимодействия антибиотика с белками и рРНК рибосомы. В результате было впервые установлено, что терморубин дестабилизирует aa-тРНК в А-сайте, что приводит к преждевременной терминации биосинтеза белка или к ускоренной транслокации, в результате которой пептидил-тРНК оказывается в Р-сайте рибосомы.

На основании анализа диссертационной работы Мариной Валерии Ивановны и научных работ, опубликованных диссертантом, можно заключить, что тема работы интересна и актуальна, полученные результаты достоверны и обладают новизной, положения, выносимые на защиту, обоснованы.

Вместе с тем, имеется ряд замечаний и вопросов к рукописи.

1. Как уже упомянуто выше, в тексте диссертации не приводятся условия проведения электрофореза для коротких пептидов (процент геля, напряжение, охлаждался гель или нет, и т.п.) и нет указания, какие конкретно растворы применялись для приготовления полиакриламидных гелей.
2. Требуется пояснение, почему при изучении активности антибиотиков с использованием BODIPY-системы трансляции в реакционную среду добавляли fMet-тРНК^{fMet} для «преобразования ВРУ-Met-тРНК^{fMet} в продукты трансляции» (стр. 48).
3. Для трансляции *in vitro* использовались длинные последовательности мРНК. Почему была выбрана именно такая длина матриц для синтеза коротких, от 2 до 6 аминокислотных остатков, пептидов и как это согласуется с утверждением, что «более длинные матрицы в принципе сложнее транслировать, чем короткие» (стр. 61)?

4. Рисунок 46 с Toe-print анализом действия антибиотика цистоцина можно улучшить приведением размера геля и подписи нуклеотидов/аминокислот к более близкому масштабу, которое на данном рисунке имеет явное несоответствие.
5. На рисунке 57 нет пояснения, что такое 17 нуклеотидов (гель слева) и 16 нуклеотидов (гель справа), показанных двусторонней стрелкой. На правом геле нет пояснения, почему эритромицин вызывает остановку только в этом положении (10-11 аминокислотных остатков?) и что это означает.
6. Прошу пояснить фразу на стр. 98 «на большинстве матриц терморубин вызывает остановку на стоп-кодоне, вероятно ингибируя терминацию трансляции. Также есть ряд остановок вдоль всей мРНК».

Также имеется ряд опечаток. Как правило, применяется написание «рентгеноструктурный анализ», а не «рентген-структурный анализ» (стр. 93). На этой же странице утверждается, что «было принято решение с помощью крио-ЭМ получить структуру рибосомы с терморубином», но ниже говорится, что этого получены кристаллы рибосомы *T. thermophilus*.

Указанные замечания имеют преимущественно редакторский характер или требуют некоторых пояснений, упущенных при написании диссертации. Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Марина Валерия Ивановна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, заместитель директора по науке, главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
белка Российской академии наук

Никулин Алексей Донатович

05 ноября 2025 г.