

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**

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

Антибиотики уже около 80 лет являются основными средствами борьбы с бактериальными инфекциями, и во всем мире десятки, а то и сотни миллионов людей ежегодно обязаны своим здоровьем эффективно работающим антибиотикам. Однако эффективность работы антибиотика не является его постоянным свойством, поскольку бактерии способны приобретать резистентность к антибиотикам, что делает их неэффективными. Поэтому проблема поиска и разработки новых антибиотиков и изучения их антибактериальной активности была и остается горячей актуальной задачей. Одной из основных мишеней для действия многих антибиотиков в бактериальной клетке является рибосома, поэтому очевидно, что разработка новых и совершенствование уже имеющихся систем для анализа действия антибиотиков на бактериальные рибосомы является актуальной задачей. Столь же очевидно, что для грамотного использования уже известных антибиотиков и для разработки новых необходимо понимание механизмов их действия на рибосомы. Поэтому не вызывает сомнения актуальность темы настоящей работы, направленной на разработку простой и доступной и системы для тестирования ингибирующего действия антибиотиков на отдельные этапы белкового синтеза на рибосомах бактерий и на установление механизмов действия двух антибиотиков – терморубина и цистоцина.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

В своей работе автором разработана новая, простая в исполнении и, я бы сказал, элегантная система для того, чтобы устанавливать, какую именно стадию трансляции ингибирует исследуемый антибиотик. До сих пор для получения подобной информации было желательно иметь полный набор индивидуальных компонентов аппарата трансляции, в частности, тРНК и факторов (что очень дорого), и получать набор комплексов, имитирующих ту или иную стадию процесса (что трудоемко). Разработанная же В.И. Мариной система не требует наличия индивидуальных факторов и получения набора комплексов — достаточно иметь коммерчески доступную бесклеточную систему трансляции и одну меченую BODIPY инициаторную метионил-тРНК. Это позволяет перевести проблему установления ингибируемой антибиотиком стадии трансляции на совершенно иной уровень по простоте исполнения и доступности. С применением этой системы и набора самых современных методов и подходов в работе проведены доскональные комплексные исследования, позволившие уточнить механизм ингибирующего действия на рибосому антибиотика терморубина и установить *de novo* механизм действия цистоцина. Примечательно, что для выделения цистоцина использован новый стрептомицетовый продуцент.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Практическая значимость разработанной автором BODIPY-системы трансляции состоит в том, что она позволяет без больших затрат средств, времени и усилий тестировать действие любых препаратов на белковый синтез на рибосомах бактерий и определять стадии трансляции, которые блокируется препаратом. Возможности разработанного метода были блестяще продемонстрированы автором на примере набора антибиотиков, для которых известны блокируемые стадии трансляции. Установление механизмов

ингибирующего действия на рибосому терморубина и цистоцина расширяет знания о влиянии антибиотиков на трансляционный аппарат бактерий. Терморубин, который действует селективно на бактериальные рибосомы, представляет интерес в плане использования его в медицине. Полученная в работе детальная информация о различных аспектах взаимодействия терморубина с рибосомой представляет практическую ценность для разработки новых эффективных и селективных ингибиторов трансляции у бактерий на основе данного антибиотика.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 121 странице основного текста, который сопровождается тремя приложениями в общем на 15 страницах. Текст вместе с приложениями содержит 13 таблиц и 79 рисунков. Список цитируемой литературы включает 163 источника. Работа написана по традиционной схеме и включает основные разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Выводы” и “Заключение”.

В разделе “Введение” кратко изложены актуальность работы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также методология, использованная в диссертационном исследовании. Здесь же даны положения, выносимые на защиту, и приведена информация об апробации работы, количестве публикаций и личном вкладе автора. Положения, выносимые на защиту, логично вытекают из “Введения” представляются вполне обоснованными.

В “Обзоре литературы” автор дает краткое описание работы белоксинтезирующего аппарата бактерий и рассматривает методы, с помощью которых можно следить за ходом трансляции и ингибирующим эффектом антибиотиков на этот процесс. Отдельная часть этого раздела диссертации

посвящена подробному описанию и характеристике флуоресцентной метки BODIPY, на использовании которой основана разработанная В.И. Мариной система для установления этапов трансляции, на который воздействует исследуемый антибиотик. Обзор достаточно информативен и завершается кратким заключением, логично подводящим к поставленным в работе задачам. Глава “Материалы и методы” содержит подробный список используемого оборудования, реактивов и биопрепаратов, включая нуклеотидные последовательности ДНК-матриц и использованных праймеров. Здесь же приведены составы буферных растворов и штаммы микроорганизмов. Описание применяемых автором методик и экспериментальных процедур дано достаточно подробно; представляется, что деталей дано достаточно для воспроизведения экспериментальных результатов автора.

Наибольший объём в диссертации отведён главе “Результаты и обсуждение”, в которой автор приводит непосредственно описание полученных данных. В первой части этой главы автор последовательно описывает шаги, позволившие на основе использования инициаторной метионил-тРНК, меченой BODIPY, разработать систему для анализа коротких пептидов, образующихся в результате сопряженной транскрипции-трансляции модельных ДНК-матриц в коммерчески доступной бактериальной системе. Автором подобраны оптимальные условия трансляции, гидролиза образующихся пептидил-тРНК в случае использования матриц без стоп-кодонов и возможность следить за ходом терминации трансляции в случае матриц со стоп-кодоном. Природа образующихся пептидов подтверждена сравнением их электрофоретической подвижности с таковой у соответствующих пептидов, синтезированных химически. Наконец, применимость метода была блестяще продемонстрирована на примере тестирования набора антибиотиков, для которых известны ингибируемые стадии трансляции. Во второй части главы описано сравнительный анализ действия на рибосому антибиотиков цистоцина и пурамицина с использованием оригинальной разработанной в НИИФХБ им. А.Н.

Белозерского двойной репортерной системы, тоу-принт анализа и разработанной автором BODIPY-системы трансляции. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что цистостин, как и пуромидин, ингибирует трансляцию в результате переноса на себя растущей пептидной цепи. В третьей части главы приведены результаты систематического исследования влияния терморубина на трансляционный аппарат бактерий с помощью впечатляющего набора самых современных подходов, включающих наряду с упомянутыми выше, методы быстрой кинетики, рентгеноструктурного анализа высокого разрешения, и моделирования структур рибосомных комплексов на основе доступных атомных моделей. Сопоставление полученных данных с результатами применения к терморубину BODIPY-системы трансляции позволило В.И. Мариной сделать выводы о том, что терморубин не препятствует связыванию молекул тРНК в Р и А-сайтах рибосомы, но меняет строение А-сайта так, что связывание аминоксил-тРНК в нем становится лабильным, а факторы терминации 1-го класса вообще теряют способность к связыванию. Глава завершается выводами и Заключение, которые полностью обоснованы и логически вытекают из полученных результатов.

Результаты работы автора описаны в 4-х статьях в международных рецензируемых научных журналах и представлены в виде докладов на 3-х конференциях. Всё это указывает на живой интерес научного сообщества к полученным результатам и их большой значимости как для дальнейшего развития исследований в данной области и перспектив их использования в медицине.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ

Диссертационная работа Мариной Валерии Ивановны выполнена на высочайшем научном и методическом уровне, она хорошо иллюстрирована, все схемы приведены в наиболее простом и понятном исполнении, что

упрощает прочтение и понимание работы. В работе получены оригинальные и значимые для научного сообщества результаты, достоверность которых не вызывает сомнений. Однако достоинства работы частично являются источником ее некоторых недостатков – благодаря высокому качеству и значимости результатов, все они опубликованы в престижных англоязычных журналах, и, вероятно поэтому в тексте диссертации достаточно много англицизмов и неуклюжих выражений, появившихся, очевидно, в результате перевода собственных англоязычных текстов – например, выражение «пуромицин-укороченные пептиды» на с. 79.

По тексту диссертации имеется ряд вопросов и замечаний.

1. В схеме цикла элонгации, приведенной на рис.3, не отражен принципиально важный аспект – гибридные состояния тРНК - А/Р и Р/Е. Кроме того, в конце цикла деацилированная тРНК самопроизвольно диссоциирует с рибосомы, хотя сейчас принято считать, что она диссоциирует при связывании аминоксил-тРНК в А-сайте на следующем цикле элонгации.
2. В разделе 2 главы «Материалы и методы» указано, что в работе использовали Tris-HCl (Sigma). Если это действительно так, чем его титровали, чтобы получать буферы с рН в районе 7-8?
3. В той же главе неоднократно встречается никак не расшифрованное таинственное соединение milliQ.
4. Хотелось бы услышать объяснения, почему электрофоретическая подвижность BODIPY-меченых олигопептидов, обладающих суммарным зарядом всего -1 за счет концевой карбоксильной группы, сопоставима с таковой для тРНК, имеющей почти на 2 порядка больший отрицательный заряд.
5. Вопрос, связанный с предыдущим – можно ли применять эту BODIPY-систему для анализа трансляции мРНК, кодирующих пептиды, в состав которых входят положительно заряженные аминокислотные остатки и суммарный заряд которых может быть нулевым или положительным?

6. На с. 80 сказано, что для реализации тоу-принт анализа необходима радиоактивная изотопная метка (^{32}P), что накладывает ряд ограничений на применение этого подхода. Известно, что во многих случаях сейчас в полимеразных реакциях вместо радиоактивной метки используют флуоресцентные. Почему это невозможно в случае тоу-принт анализа?
7. На рис. 49 и в тексте на с. 84-85 отмечены нуклеотиды спирали H69 23S рРНК, прямо или косвенно участвующие во взаимодействии терморубина с рибосомой, но не указано, как эти нуклеотиды расположены относительно А- и Р-сайтов рибосомы - без этого трудно обсуждать результаты и делать выводы и предположения.
8. Рис. 54 трудно интерпретировать, поскольку прочесть приведенную на нем электрофореграмму и понять, на каких нуклеотидах мРНК произошли остановки обратной транскрипции, невозможно.
9. На с. 104 в конце раздела 1.3.3.4 сказано, что одним из следствий действия терморубина на рибосомный комплекс является «быстрая транслокация и перенос пептидил-тРНК в Р-сайт». Не очень понятно, каким образом это связано с ингибированием трансляции, которое вызывает этот антибиотик?

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, доцент,

ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функции рибосом ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

Грайфер Дмитрий Маратович

19 ноября 2025 г