

**ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации 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**

Работа Мариной Валерии Ивановны посвящена изучению механизмов влияния антибиотиков цистоцина и терморубина на процессы биосинтеза белка.

Для этих целей автор разработала бактериальную систему трансляции с использованием BODIPY-меченной формилметионовой тРНК, которая с помощью метода электрофоретического разделения в геле позволяет высокочувствительно и специфично детектировать как пептидил-тРНК, так и сами пептиды с разрешением в один аминокислотный остаток. Такая система позволяет точно определить, на какой конкретно этап трансляции влияет внесенный антибиотик. Наличие такой легкодоступной системы для изучения процессов трансляции весьма актуально и важно, ведь другие подобные методы на настоящий момент более трудозатратны.

Далее, с использованием данной системы, а также множества других классических методов изучения трансляции, автор показала, на какие из этапов трансляции влияют два малоизученных до этого антибиотика, цистоцин и терморубин, а также предложила механизм их действия. Кроме того, автор с коллегами описала и сравнила токсичность этих антибиотиков в клетках бактерий и эукариот. Результаты, полученные автором, развивают понимание механизмов биосинтеза белка, а также разнообразие мишеней участников, на которые может воздействовать исследователь. Кроме фундаментального значения, данные результаты, несомненно, важны и в практической медицинской плоскости, где имеется потребность в новых антибиотиках. Крайнюю актуальность данной темы дополнительно подтверждает тот факт, что научные конкуренты лаборатории, в которой работает автор, также активно пытаются изучать механизм действия

терморубина в трансляции, что приводит, как и в случае автора, к публикациям в ведущих научных журналах по молекулярной биологии.

Валерия Иванова в тексте работы подробно описывает методологию и результаты своих экспериментов, исходя из которых проводит внимательное и критическое обсуждение, сопряженное с подробным анализом литературы. В итоге, выводы и положения, выносимые на защиту, логичны, полностью вытекают из полученных результатов, достоверны, значимы и не вызывают сомнений. Отдельно хочется отметить, что Валерии Ивановне удастся не только точно описывать и обсуждать результаты, но и писать текст в крайне понятном и ёмком стиле, сопровождая его крайне иллюстративными схемами. Всё это очень помогает вникнуть в глубину проделанной работы.

Однако, имеются следующие вопросы:

- 1) автор заявляет, что при изучении активности антибиотиков с использованием BODIPY-системы трансляции лимитирующим компонентом являлись рибосомы, поэтому в реакционную смесь наряду с ВРҮ-Мет-тРНК_ф^{Мет} добавляли немеченный фМет-тРНК_ф^{Мет}, чтобы преобразовать весь ВРҮ-Мет-тРНК_ф^{фМет} в продукты трансляции. Не очень понятно, как это помогает именно заявленной цели. Ведь трансляция в любом случае начинается с аминоацилированной тРНК_ф^{Мет} (меченной или не меченной). И, напротив, меченная тРНК конкурирует с немеченной за эти лимитированные рибосомы, снижая выход меченного пептида?
- 2) не могут ли длинные пептиды MF4 и MF6 иметь меньшие интенсивности пятен на рис. 29 за счёт их агрегации вследствие гидрофобного эффекта, что могло бы препятствовать их вхождению в гель по аналогии с меченым пуромицил-пептидом (рис. 70)?
- 3) при обсуждении результатов рис. 38 автор пишет, что комбинация факторов терминации трансляции RF2 + RF3 менее эффективна в терминации, чем RF1 + RF3. И хотя такая тенденция, по-видимому, есть, этот эффект не универсальный и может зависеть от контекста UAA

кодона (Martin et al., 1988, Journal Of Bacteriology, <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4714-4717.1988>). Кроме того, автор проводит эксперименты в системе на основе лизата, где есть все компоненты цитозоля. Поэтому наблюдаемое отличие в эффективности факторов терминации трансляции может быть связано не только с эффективностью факторов самих по себе, но и с их конкуренцией с тРНК за связывание рибосомы, у которой в А-сайте расположен стоп-кодон (т.е. конкуренцией процессов терминации и сквозного чтения стоп-кодона). Полученные автором данные хорошо согласуются с каноничным представлением, что на кодоне UAA наиболее эффективна терминация, а на кодоне UGA – сквозное чтение (см., например, Zhang et al., 2020, PNAS, <https://doi.org/10.1073/pnas.201354311>). Но это лишь комментарий к углублению фундаментальных объяснений, он несколько не подвергает сомнению основной, практичный, вывод о том, что система прекрасно детектирует высвобождение синтезированного пептида в результате терминации трансляции на любом стоп-кодоне с обоими RF I класса;

- 4) на рис. 42 не смешались ли области с ципрофлоксацином и цистоцином, раз их поля без бактерий почти пересекаются? И могло ли это повлиять на результат и, в частности, на то, что с цистоцином, в отличие от пурамицина, можно наблюдать как будто более выраженное зеленое гало? Также хотелось бы комментария, насколько это выраженный эффект? Так, на рис. 50 эффект от воздействия терморубина кажется гораздо выражение, чем от эритромицина, а на рис. 42 оба изучаемых антибиотика относительно эритромицина почти не светят;
- 5) на рис. 54 для матриц RST-2, ERML, ErmCL в отсутствие тиострептона, по сравнению с точкой с антибиотиком, наблюдается более выраженное «двоение» полос кДНК в районе старт-кодона. Есть ли у автора этому объяснение?

Кроме того, имеются частные замечания:

- 1) на рис. 8 ошибочно указано, что в основе обозреваемой там бесклеточной системы трансляции находится фракция S100 (названная в тексте как «100S») клеточного лизата, тогда как на самом деле в её основе лежит фракция S30 (см. инструкцию к E5360, New England Biolabs). Однако, это лишь создает трудность в восприятии малозначительной детали неподготовленному читателю и никоим образом не искажает смысл работы;
- 2) на рис. 51 не видно кривой «терморубин 80 мкМ» (розовая). Вероятно, она сливается с кривой для пуромицина;
- 3) не понятно, что на рис. 54 отражают дорожки обрыва синтеза с отдельными нуклеотидами, если использовано 4 различных мРНК с отличающимися последовательностями. Вероятно, для демонстрации нормального протекания электрофореза взята лишь одна из них, но лучше было это пояснить;
- 4) Праймеры CER_FAM_R, FAMnoFAM в таблице 3 в своем названии содержат отсылку на флуоресцентную метку FAM, однако, в реальности её не содержат. Это немного путает при чтении и анализе данных;
- 5) Вместо общеупотребимого и введенного в тексте диссертации сокращения нетранслируемой области как «НТО» на рис. 19 используется аббревиатура «НКО»;
- 6) При верстке ссылки 70 в её название попала лишняя информация: «Egorova T. et al. Engelhardt Institute of Molecular Biology , The Russian Academy of Sciences 119991 , // Methods. Elsevier Inc., 2019. № 2019».
- 7) местами с терминами на русском языке соседствуют английские слова, имеющие широко употребляемые аналоги в русском языке (к примеру, союз «and», единицы времени «ms», «s» и вещество «tRNA» на рис. 1), а также одно и то же вещество называется по-разному (ВРҮ-Мет-тРНК^{фМет} и ВРҮ-Met-тРНК^{fMet} на стр. 48). Это выглядит несколько

стилистически эклектично, но, с другой стороны, и не препятствует пониманию сути рисунка и не является критичным.

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:
кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник
лаборатории механизмов и контроля трансляции
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

БИЗЯЕВ Никита Сергеевич

10.11.2025