

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук Лукьянова Дмитрия Александровича на тему: «Поиск новых антибиотиков. Изучение механизма действия репомиицина, тетраценомицина X и аурапланина» по специальностям 1.4.9 – «биоорганическая химия», 1.5.3 – «молекулярная биология»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

Тема работы автора диссертации связана с чрезвычайно «горячим» направлением современных исследований в области естественных наук – поиском новых антибиотиков и изучением механизмов их действия. Открытие антибиотиков – специфических продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, в своё время совершило революцию в медицине и позволило человечеству успешно бороться с инфекционными заболеваниями. Однако к настоящему моменту многие известные антибиотические вещества из-за широкого их применения становятся неэффективными по причине развития резистентности к ним у бактерий. Это ведет к существенному снижению эффективности используемых антибиотиков, и устойчивость к антибиотикам в наши дни становится одной из самых больших угроз снижения продолжительности жизни людей. Таким образом, проблема поиска новых соединений с антибиотической активностью в настоящее время стоит очень остро. При этом понимание механизма действия таких соединений позволяет в дополнение к поиску антибиотиков среди веществ природного происхождения проводить химический дизайн уже известных молекул. В этой связи актуальность темы диссертации бесспорна.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

В своей работе автор впервые использовал высокопроизводительный поиск веществ с антибиотической активностью на роботизированной станции Janus, применяя оригинальную репортерную систему, и проверил на

антибактериальную активность 60213 индивидуальных соединений. При помощи данного подхода был обнаружен новый ингибитор трансляции репомидин, действующий на рибосому, и доказано, что это соединение обладает антибиотической активностью. В этой же работе автор впервые корректно описал антибиотик тетраценомицин X как ингибитор трансляции, а не интеркалятор ДНК, и детально исследовал механизм его действия. В сотрудничестве с зарубежными коллегами автором была получена крио-ЭМ структура комплекса антибиотика с рибосомой, и определён сайт его связывания. Наконец, автором был обнаружен новый антибиотик аурапланин, изучен механизм его действия и установлен его участок связывания на рибосоме, отличающийся от участков связывания других известных антибиотиков.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Значимость диссертации состоит в том, что автором экспериментально продемонстрирована высокая производительность проверки на антибактериальную активность более 500 соединений одновременно, и была оценена активность свыше 60 тысяч соединений. Благодаря этому, в работе были найдены и охарактеризованы новые антибиотики – ингибиторы белкового синтеза. Приведённые в диссертации данные о химической структуре этих соединений открывают потенциал для их дальнейшей модификации, что, несомненно, имеет большую значимость как для научных исследований, так и для медицины.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертация изложена на 167 страницах и содержит 13 таблиц и 69 рисунков. Список цитируемой литературы включает 193 источника. Работа написана по традиционной схеме и включает основные разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение” 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.

В “Обзоре литературы” автор знакомит читателя с современным научным взглядом на основные принципы трансляции, проблематикой поиска веществ с антибактериальной активностью и даёт сводную характеристику веществ, структурно похожих на тетраценомицин X и аурапланин – основные объекты исследований работы. В целом, обзор достаточно информативен и помогает глубже понять суть изучаемых в диссертации вопросов.

Глава “Материалы и методы” содержит подробный список используемого оборудования, реактивов и биопрепаратов, здесь же приведены составы буферных растворов и штаммы микроорганизмов; такая систематизация позволяет легко ориентироваться в необходимой информации. Описание применяемых автором методик и экспериментальных процедур дано достаточно подробно, что при желании позволяет их легко воспроизвести или использовать в качестве лабораторного протокола.

Наибольший объём в диссертации отведён главе “Результаты и обсуждение”, в которой автор приводит непосредственно описание полученных данных. В начале автор описывает высокопроизводительный скрининг соединений из химических библиотек и природных образцов на антибактериальную активность. Количество исследованных образцов впечатляет – 60213 и свыше 6000 соответственно. Среди химических соединений автор находит новый ингибитор трансляции, названный репомичином, и исследует его. Однако данная молекула проявила высокую токсичность и для эукариот, что не позволяет использовать её в качестве лекарственного препарата. В природных образцах автор обнаружил ещё два ингибитора трансляции: тетраценомицин X, известный в литературе ранее, и

новый – ауропланин. Исследуя тетраценомицин X, автор показывает, что антибактериальный эффект этой молекулы, вопреки прежним представлениям, связан с ингибированием трансляции, а её мишенью является рибосома. Для ауропланина автор находит новый продуцент и описывает мутации в 16S рРНК и рибосомном белке S4, которые придают устойчивость клеткам к этому соединению. Автор также показал, что ауропланин является антагонистом стрептомицина и способен повышать точность трансляции, сниженную присутствием стрептомицина.

Результаты работы автора описаны в 6 статьях в рецензируемых научных журналах и представлены в виде докладов на 4 конференциях. Всё это указывает на живой интерес к научного сообщества к полученным результатам и их исключительной значимости как для дальнейшего развития исследований в данной области, так и для медицины.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ. Хотя диссертационная работа Лукьянова Дмитрия Александровича выполнена на высочайшем научном уровне и в ней получены поистине весомые и значимые для научного сообщества результаты, следует высказать ряд вопросов и замечаний по тексту диссертации. Во-первых, текст диссертации выглядит несколько неряшливо, что снижает общее впечатление от самой по себе яркой работы. С самого начала, список сокращений не систематизирован по английским и русским названиям, английским сокращениям дана русскоязычная расшифровка, а РНК вообще названа “оксирибонуклконовая”. Кстати, сами сокращения в тексте то используются, то нет.

Далее, во “Введении”, присутствует логическая путаница объекта и процесса с участием объекта во фразах “...аппарат для синтеза белка – рибосома. Этот процесс состоит...” (стр. 7) и “рибосомы и синтез белка являются физиологической мишенью” (стр. 9). Отсутствие знаков препинания затрудняет понимание первой фразы последнего абзаца раздела, описывающего актуальность исследования, а что скрывается под термином “мутации устойчивости” остаётся нераскрытым.

В “Обзоре литературы” встречается неправильная терминология, напр.: “транслированный белок” (стр. 20) вместо “синтезированный белок”, “последовательность Шайна-Дальгарно ... комплементарна 3’-концу 16S РНК” (там же) вместо “комплементарна 3’-концевому участку в 16S РНК”, “декодинг” (там же) вместо “декодирование”, “большая канавка” (стр. 56) вместо “большая бороздка”, “Грамм минус бактерии” и “Грамм положительные бактерии” (стр. 57) вместо “грамотрицательные” и “грамположительные” бактерии, а фраза “ион магния координируется кодоном рибозы” (стр. 24) просто оставляет в недоумении. Также возникает путаница от неиспользования курсива в написании обозначений генов, из-за чего непонятно, когда речь идёт о белках, а когда – о генах, напр.: “оба *tcmK* и *tcmL* подобны гену *FabB*”. К рисункам 4 и 6 было бы весьма желательно видеть пояснительные подписи, а к фразам на стр. 13 (абзац 2) и стр. 22 (последний абзац) – ссылки. Наконец, в данном разделе явно не хватает заключения, в котором бы автор кратко суммировал накопленные и недостающие знания, дающие предпосылки к его работе.

В главе “Материалы и методы” в таблице 3 приведены последовательности матриц, использованных в анализе с применением метода тоу-принтинга. Как видно из этих последовательностей, матрицами являлись РНК, что логично, поскольку тоу-принтинг проводят на трансляционных комплексах рибосом. Однако в этом же разделе 2.12 сказано, что в реакцию для проведения тоу-принтинга добавляли именно ДНК-матрицы, которые, как следует из дальнейшего повествования, получали с помощью ПЦР-амплификации. По-моему, здесь какая-то ошибка.

По разделу “Результаты и обсуждение” есть два вопроса. На стр. 88 на основании опытов по тоу-принтингу с антибиотиком репомидином автор обнаруживает остановки трансляции на первом, втором и восьмом кодонах мРНК, на основании чего выдвигает гипотезу, что данный ингибитор влияет на кинетику трансляции на участках мРНК, которые рибосома проходит с большим трудом. Непонятно, почему рибосоме должно быть трудно

проходить участки первого и второго кодонов? Если дело во вторичной структуре мРНК, то её можно бы было рассчитать, а если подразумевается движение синтезируемого пептида по тоннелю, то дипептид не должен существенно взаимодействовать с его стенками. Второй вопрос связан с рис. 41. Сигнал от ингибитора TsmX выглядит оранжевым, то есть, как смесь красного и зелёного сигналов, которые интерпретируются как ингибирование трансляции и повреждение ДНК соответственно. Однако сделан вывод, что TsmX ингибирует биосинтез белка и не вызывает повреждений ДНК. На мой взгляд, это требует пояснения.

К числу упущений также следует отнести отсутствие в основном тексте работы раздела “Выводы”. Тем не менее, выводы присутствуют в автореферате, они обоснованы и подтверждены результатами экспериментов автора.

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 паспортам специальностей 1.4.9 — “биоорганическая химия” и 1.5.3 — “молекулярная биология”, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лукьянов Дмитрий Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 1.4.9 — “биоорганическая химия” и 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»

Малыгин Алексей Аркадьевич

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.04 – биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 8,
ИХБФМ СО РАН, Лаборатория структуры и функции рибосом

Подпись сотрудника ИХБФМ СО РАН Малыгина А.А.
удостоверяю: