

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

**Актуальность избранной темы.** Представленная работа Дмитрия Александровича Лукьянова посвящена поиску новых антибактериальных средств, что соответствует направлению НЗ «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)» Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации. Действительно, вопрос преодоления антибиотикорезистентности у бактерий представляет весьма сложную и актуальную проблему молекулярной биологии. Наиболее серьезной эта проблема возникает при лечении особо опасных бактериальных инфекций, таких как туберкулез, и раковых образований. Возможными путями решения этой проблемы является нахождение новых антибиотиков, ранее не использовавшихся для лечения заболеваний, к которым у патогенов еще не имеется устойчивости, или модификация имеющихся лекарственных средств для преодоления антибиотикорезистентности.

Работа Дмитрия Александровича направлена на поиск новых антибиотиков и определение механизма их функционирования в бактериальных клетках. Для отбора и тестирования новых соединений была использована репортерная система pDualrep2, разработанная ранее в лаборатории, где диссертант выполнял работу, а поиск производили на роботизированной системе Janus. Это позволило оттестировать большое количество, более 60 тысяч, индивидуальных соединений, содержащихся в

химической библиотеке InterBioScreen. Интересно, что только одно соединение из 60 тысяч удовлетворяло необходимым критериям потенциального лекарственного средства. Кроме того, был проведен поиск потенциальных антибактериальных средств среди культуральных жидкостей ряда микроорганизмов и мицелиальных грибов, в которых были найдены еще ряд антибиотиков.

Найденные соединения были выделены в чистом виде, определены их химические формулы, охарактеризованы структуры, проведены тесты на антибактериальную активность, токсичность по отношению к эукариотическим клеткам, предложен механизм их действия на бактерии, для соединений Тетраценомицин X и Аурапланин определены участки связывания на бактериальных рибосомах. Для Тетраценомицина X и Аурапланина получены структуры рибосом с этими соединениями методом криоэлектронной микроскопии, напрямую показаны места их связывания на 50S и 30S субчастицах, соответственно. Структуры рибосом в комплексах с этими соединениями позволили подтвердить предложенные на основе полученных в данной работе биохимических данных механизмы ингибирования трансляции и объяснить влияние мутаций в рибосомной рРНК на устойчивость к перечисленным антибиотикам.

**Научная новизна** работы Дмитрия Александровича представляется весьма значимой, поскольку были найдены не только оригинальные химические соединения, проявляющие антибактериальную активность, но и они были всесторонне охарактеризованы. Несмотря на то, что найденные соединения оказались также токсичными для эукариотических клеток, ввиду своей оригинальности они могут стать основой для разработки новых эффективных антибиотиков. Способствовать этому может и получение структур бактериальных рибосом в комплексе с Тетраценомицином X и Аурапланином, что позволит осознанно и целенаправленно подойти к модификации указанных соединений для нивелирования отрицательной активности с сохранением антибактериальной.

**Степень обоснованности научных положений и их достоверность** подтверждается как большим объемом повторов и наличием необходимых контролей, так и успешным представлением результатов в виде статьи в одном из ведущих научных журналов (Nature Chemical Biology), а также еще 5 статей в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были опробованы на восьми научных конференциях, включая такие значимые международные конференции как FEBS Congress и Russian International Conference On Cryoelectron Microscopy.

**Общая характеристика представленной рукописи.** Диссертационная работа Д. А. Лукьянова написана в классическом стиле и включает обзор литературы, материалов и методов, полученных результатов и их обсуждении. Глава «Обзор литературы» включает разделы, посвященные основным этапам трансляции на бактериальных рибосомах, краткой характеристики методов поиска соединений с антибактериальной активностью и сравнительной характеристикой веществ, сходных по структуре с рассматриваемыми в диссертационной работе.

Раздел «Материалы и методы» в достаточной степени описывает используемые в работе материалы и применяемые методы. Особое место в рукописи совершенно справедливо отведено разработанной ранее в лаборатории двойной репортерной системе pDualrep2, которая позволяет не только оценить антибактериальную активность химических соединений, но и определить направление действия антибактериального соединения по разной флуоресценции тестовой системе. Это позволяет различить механизм действия антибиотика между появлением трансляции и индукцией SOS-ответа в бактерии.

Глава «Результаты и обсуждение» посвящена конкретным веществам, идентифицированным в работе, определению их минимальной ингибирующей концентрации, тестированию на цитотоксичность по отношению к эукариотическим клеткам, определению структур молекул, идентификации мест посадки в рибосоме и рассмотрению структур молекул антибиотиков в

составе их комплексов с рибосомой. Было рассмотрено три вещества: репомидин (идентифицирован в составе библиотеки химических соединений InterBioScreen), тетраценомицин X (идентифицирован как ингибитор трансляции в культуральной жидкости *Amycolatopsis* sp. A23) и аурапламин (выделен из культуральной жидкости *Actinoplanes* sp. ВКМ Ас-2862). Эти вещества и их антибактериальное действие было исследовано в разной степени.

Для репомидина было показано, что он значительно подавляет трансляцию в бесклеточной системе на основе лизата *E. coli*, однако, к сожалению, данное вещество является цитотоксичным для различных культур клеток человека. Был применен метод тоупринтинга для идентификации места остановки транслирующей бактериальной рибосомы, однако полученные результаты не позволяют однозначно идентифицировать его. Автор утверждает, что небольшие изменения в интенсивности полос при тоупринт-анализе по сравнению с контролем поддерживают гипотезу об увеличении затруднения прохождения участков мРНК на 5'-конце, однако требуется больше экспериментальных данных для подтверждения этой гипотезы.

Значительная часть работы посвящена исследованию тетраценомицина X (TcmX), и это действительно очень проработанная часть, опубликованная в виде статьи в журнале *Nature Chemical Biology*, где Д. А. Лукьянов является соавтором. Была установлена структурная формула этого вещества; показано, что TcmX ингибирует синтез белка и связывается в туннеле рибосомы для выхода растущего полипептида, а не встраивается в ДНК, повреждает ее и вызывает SOS-ответ; связывается как с бактериальными, так и с эукариотическими рибосомами. Кроме того, была получена структура TcmX в комплексе с 70S рибосомой, что позволило напрямую показать участок связывания антибиотика на 23S рРНК в области оснований U2609 и U2586, описать влияние наличия TcmX в туннеле 50S субчастицы на процесс элонгации трансляции и предложить механизм возникновения устойчивости клеток к TcmX при мутациях в прилегающих участках 23S рРНК.

Третий объект исследования – новое соединение, аураплагин. Для него также была определена структурная формула на основе данных масс-спектрометрии и ЯМР; показано, что он является ингибитором синтеза люцеферазы в бактериальной бесклеточной системе трансляции, но не ингибирует трансляцию в эукариотической системе. На основе результатов тоупринтинга предложено, что аураплагин вызывает кодон-специфическую остановку трансляции. В работе показано, что аураплагин связывается с 16S рРНК в области рибосомного белка S4 и нуклеотида A509 16S рРНК. Полученная структура 70S рибосомы в комплексе с аураплагинном выявила, что сайт посадки этого антибиотика является уникальным, отличающимся от ранее найденных участков посадки известных антибиотиков. При проведении антибактериальных тестов выяснилось, что он проявляет слабую активность в отношении значительного числа бактерий, за исключением *Mycobacterium tuberculosis*, однако он также является токсичным и для эукариотических клеток, что не позволяет его использовать без значительных модификаций структуры.

В целом, объем проведенных исследований представляется очень значительным. Были успешно использованы ранее разработанные в лаборатории методики применения репортерной системы pDualrep2 для поиска новых антибактериальных соединений как в коммерчески доступной библиотеке химических соединений, так и в природных источниках. В результате работы были отобраны три соединения, которые были детально охарактеризованы структурно; для двух из них выявлены принципы влияния на биосинтетическую систему бактерий, определены участки их связывания на рибосоме, предложено объяснение причин возникновения устойчивости к этим антибиотикам при мутациях в рРНК.

Однако, представленная рукопись вызывает ряд замечаний и вопросов.

- 1) Не очень убедительным выглядят результаты тоупринтинга для репомидина, поскольку изменения в интенсивности полос на геле незначительно отличаются от контроля с раствором DMSO. Эта

разница на грани погрешности концентраций при нанесении образца на гель.

- 2) При обсуждении причины возникновения устойчивости к TcmX при заменах U2609 не раскрыто возможное (и очевидное) возникновение стерических затруднений связывания антибиотика в данной области из-за потери водородных связей основания с A752 и сдвига U2609 в карман связывания. В оригинальной статье автора такая возможность рассмотрена и даже несколько излишне аккуратно изложена. В диссертационной работе можно было бы эту гипотезу рассмотреть более смело.
- 3) Не указано возможное формирование водородной связи между гидроксильной группой аурапланина с концевой аминогруппой боковой цепи лизина Lys77 белка S4, что может способствовать увеличению сродства антибиотика к рибосоме. Как описано в диссертации, данная область на карте электронной плотности по данным криоЭМ видна с большими неточностями, поэтому, исходя из значительной гибкости боковой цепи лизина и хвостовой части аурапланина, такой контакт вполне возможен.
- 4) Текст диссертации содержит значительное число орфографических и стилистических ошибок. Наиболее значительными примерами этого являются фразы «Так, например, происходит регуляция гена tnaC стимулируется.» (стр. 26), неправильная формула «Тетрацеклина» в табл. 1 на стр. 50, «низкая активность против Грамм минус бактерий» (стр. 57). Можно только пожелать впредь намного более внимательно относиться к проверке текстов.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Дмитрия Александровича Лукьянова отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам

подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 1.4.9 – «биоорганическая химия», 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, 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», 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

28 ноября 2022 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.03 – молекулярная биология, 02.00.10 – биоорганическая химия

Адрес места работы:

142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института белка Российской академии наук

А. Д. Никулина удостоверяю:

заведующий канцелярией

О. В. Галзитская

28 ноября 2022 г.