

Отзыв официального оппонента о работе Антона Сергеевича Назарова  
«Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов  
ультравысокопроизводительного скрининга», представленной на соискание  
ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 1.5.6. – Биотехнология.

Актуальность диссертационной работы Антона Сергеевича Назарова несомненна, поскольку в ней разработаны подходы к поиску источников получения новых антибиотиков из сложной гетерогенной смеси бактерий, получены оригинальные данные о биосинтезе антибиотика амикумацина (Ami), охарактеризованы ферменты, принимающие участие в его активации и обеспечении резистентности бактерии – хозяина к этому антибиотику, исследован и предложен механизм реакции фосфорилирования нового фермента – киназы.

Работа А.С. Назарова состоит из традиционных разделов, описывающих результаты работы и их обсуждение, материалы и методы, использованные при ее выполнении, сделанные выводы. В разделе «Обзор литературы» подробно рассмотрены методы поиска антибиотиков с привлечением данных из 86-ти источников. Список цитированной литературы содержит ссылки на 102 публикации. В разделе «Приложение» приведены использованные в работе олигонуклеотидные праймеры.

Для поиска антибиотиков, присутствующих в ротовой полости бурого медведя, А.С. Назаровым был использован метод ультравысокопроизводительного микрофлюидного скрининга, созданный в лаборатории биокатализа ИБХ РАН. Скрининг показал, что штамм *Bacillus pumilus* 124 проявлял наибольшую антимикробную активность по отношению к патогену *Staphylococcus aureus*. Фракционирование методом ОФ-ВЭЖХ питательной среды после культивации в ней штамма *B. pumilus* 124 установило, что антимикробная активность штамма обусловлена продукцией антибиотика Ami.

Исследование пула бактерий, чувствительных к Ami, требовало его значительных количеств, поэтому диссертантом был проведен поиск оптимальной среды для культивирования штамма *B. pumilus* 124. Как результат, использование среды SYC привело к увеличению выхода антибиотика в 8 раз по сравнению с традиционной средой 2YT. А.С. Назаровым был оптимизирован метод очистки Ami из культуральной среды, позволивший получить высокоомогенный препарат.

Для исследования спектра активности Ami в работе была создана технология глубокого функционального профилирования, использованная для определения чувствительности индивидуальных компонентов микробиоты ротовой полости сибирского медведя, фекальной микробиоты пациентов, больных колитом, и здоровых людей к антибиотику. Культивирование одной колонии каждой из индивидуальных бактерий в присутствии градиента концентрации антибиотика привело к установлению значений МИК Ami для бактерий. Наименее чувствительными оказались штаммы грамотрицательных бактерий. Штаммы бактерий родов *Enterococcus* и *Staphylococcus* оказались чувствительны к действию антибиотика. Среди них были штаммы *E. faecium* и *S. aureus* - опасные возбудители, поскольку для них известна резистентность. Эти данные имеют несомненный интерес для медицины.

Обнаружение в геноме штамма *B. pumilus* 124 двух новых ферментов биосинтеза  $\text{Ami}$  является весьма значимым результатом диссертационной работы А.С. Назарова. Ферменты были идентифицированы в результате полногеномного секвенирования штамма *B. pumilus* 124 и биоинформатического анализа генов этого штамма и геномов нескольких родственных бактерий. Анализ кластера генов биосинтеза  $\text{Ami}$  обнаружил в непосредственной близости к ключевым генам биосинтеза  $\text{Ami}$  открытые рамки считывания, кодирующие ферменты с неизвестными функциями, предположительно, кодирующие киназу  $\text{Ami}$  и фосфатазу  $\text{Ami}$ , названные « $\text{AmiN}$ » и « $\text{AmiO}$ ». Поскольку биосинтез  $\text{Ami}$  у штамма *B. pumilus* 124 является индуцибельным, этот факт был использован для выяснения механизма регуляции биосинтеза  $\text{Ami}$ . Протеомный анализ штамма *B. pumilus* 124 в состояниях активной и значительно сниженной продукции антибиотика позволил предположить, что активация выработки связана с регуляцией его фосфорилирования в клетке. Анализ состава культуральной среды показал, что лизатах клеток присутствует неактивный фосфорилированный  $\text{Ami}$ , а в культуральной среде присутствует дефосфорилированный  $\text{Ami}$ . Действие рекомбинантного  $\text{AmiN}$  на  $\text{Ami}$  приводило к фосфорилированному антибиотику, а рекомбинантный  $\text{AmiO}$  дефосфорилировал фосфорилированный антибиотик. Т.е.,  $\text{AmiN}$  обеспечивает резистентность штамма *B. pumilus* 124 к  $\text{Ami}$ .

Функция  $\text{AmiN}$  была подтверждена в работе с клетками *E. coli*, не имеющими ген, кодирующий  $\text{AmiN}$ , с мутантной формой штамма *B. subtilis* 168, лишенной собственного гена *YerI*, кодирующего киназу, и с эукариотическими клетками НЕК293Т. Введение в эти клетки плазмиды с геном, кодирующим  $\text{AmiN}$ , приводило к повышению значений МИК для  $\text{Ami}$  в среднем в 100 раз.

Определенные кинетические параметры рекомбинантного  $\text{AmiN}$  показали, что фермент обладает уникальной для киназ антибиотиков константой Михаэлиса ( $K_M = 25$  нм) и эффективностью реакции ( $k_{\text{cat}}/K_M = 3.4 \pm 0.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), близкой к диффузионному пределу. Исследование субстратной специфичности  $\text{AmiN}$  проводилось с использованием различных потенциальных субстратов – ряда антибиотиков, структурных аналогов  $\text{Ami}$  и пептидомиметиков и выявило высокую субстратную специфичность фермента. Далее высокая субстратная специфичность фермента была подтверждена с использованием в качестве субстрата основного белка миелина и пептидов, имитирующих структуру  $\text{Ami}$  и ряда антибиотиков. Исследование субстратной специфичности киназы  $\text{hAmiN}$  из штамма *B. pumilus* 123, проведенное в работе, также установило высокую субстратную специфичность этого фермента. Это позволило диссертанту предположить, что гомологи  $\text{AmiN}$  могут принадлежать к отдельной группе киназ, отличаясь от известных киназ резистентности.

Для понимания распространения и, соответственно, важности гомологов киназы  $\text{AmiN}$  в живой природе, А.С. Назаровым был использован филогенетический анализ гомологов фермента и выравнивание известных аминокислотных последовательностей ряда киназ. В этом разделе диссертационной работы получены очень интересные данные, которые будут востребованы исследователями, изучающими феномен резистентности бактерий. Гомологи  $\text{AmiN}$  были обнаружены для многих видов бактерий рода *Bacillus*, кроме того, гомолог  $\text{AmiN}$  и гомологичный кластер биосинтеза  $\text{Ami}$  были идентифицированы у термоактиномицета *Paludifilum halophilum*. А выравнивание первичных последовательностей ферментов выявило ряд консервативных для киназ аминокислотных остатков, что, несомненно, является важной информацией для исследователей, занимающихся выяснением механизмов действия киназ.

Пространственные структуры фермента и его комплексов с АТФ, негидролизуемым аналогом АТФ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Ami}$  были определены с участием сотрудников

лаборатории биокатализа ИБХ РАН. В работе А.С. Назарова проведен анализ полученных структур для объяснения уникальных характеристик фермента. В молекуле AmiN присутствовали структурные особенности, общие с другими фосфотрансферазами - АТФ-связывающий домен, фосфотрансферный мотив Бреннера и сайт связывания металла. Выяснено, что связывание Ami вызывает значительные конформационные перестройки AmiN, приводящие к образованию закрытой формы фермента. Закрытая конформация активного центра фермента сближает остатки гамма-фосфата АТФ и гидроксильной группы Ami, что и обеспечивает возможность протекания реакции фосфорилирования, а уникальное сродство к субстрату обусловлено наличием в участке его связывания  $\pi$ -бокса, образованного системой  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий между аминокислотными остатками His204, His205, Asn238, Trp241 и Tyr242, и изокумариновой группой антибиотика. Были идентифицированы остатки аминокислот, предположительно, существенные для обеспечения закрытой конформации фермента, связывания катиона  $Mg^{2+}$ , АТФ. Аланиновый скрининг остатков активного центра AmiN показал, что остатки Asp202, Asp219 Asp222, Asn207, His204, Lys52, Arg286, Glu159 и Gln161 необходимы для эффективного катализа реакции фосфорилирования.

Для двух киназ – AmiN из штамма *B. pumilus* 124 и hAmiN из штамма *B. pumilus* 123 А.С. Назаровым было исследовано влияние двухвалентных металлов и концентрации АТФ на скорость реакции фосфорилирования. Совокупность полученных результатов показала, что для проявления максимальной активности необходим именно ион  $Mg^{2+}$  и один ион на молекулу фермента, т.е., косубстратом AmiN является комплекс [АТФ· $Mg^{2+}$ ].

Потребность только одного иона  $Mg^{2+}$  для эффективного катализа является отличной от других киназ особенностью AmiN.

Основываясь на полученных в работе данных о механизме реакции фосфорилирования далее было проведено молекулярное моделирование реакции. Оно подтвердило данные рентгеноструктурного анализа о том, что образование закрытой конформации активного центра фермента происходит при связывании субстрата, а появление продукта реакции индуцирует открытие активного центра. С использованием квантовомеханического и молекулярномеханического моделирования была выяснен постадийный механизм реакции фосфорилирования, описывающий «правильное» позиционирование Ami, диссоциацию, аниона мета-фосфата, его координацию и активацию гидроксильной группы антибиотика. Полученные А.Н. Назаровым в этой части работы результаты создали основу для установления тонких закономерностей взаимоотношения структура-функция фермента.

В диссертационной работе А.С. Назарова выполнен очень большой объем экспериментов. Приведенные в главе «Результаты работы и их обсуждение» экспериментальные данные наглядно иллюстрированы и подробно обсуждены. Выводы, сделанные для каждого из разделов, логически следуют из полученных результатов. В разделе «Материалы и методы» приводятся данные о методиках, использованных для всех экспериментов. Диссертационная работа выполнена с применением самых современных методов физико-химической биологии и свидетельствует о высоком экспериментальном и теоретическом уровнях автора. Текст работы написан грамотным языком. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание.

Результаты диссертационной работы опубликованы в трех ведущих международных журналах и доложены на отечественных и международных конференциях.

Несмотря на несомненные достоинства работы, ниже приводятся некоторые замечания, касающиеся ее оформления:

- 1) название диссертационной работы считаю неудачным, оно слишком общее;

- 2) для новых киназы и фосфатазы нужно было привести классификационные номера;
- 3) определенные в работе значения МИК аминокумацина для ряда бактерий (стр. 65) не сравниваются с опубликованными другими исследователями;
- 4) названия ферментов (стр. 67, 76, 77, 83, 84) не соответствуют рекомендациям комиссии по классификации и номенклатуре ферментов;
- 5) в списке цитированной литературы названия микроорганизмов не выделены курсивом.

Перечисленные недостатки касаются лишь оформления работы, ничуть не умаляя её актуальность, новизну и научную значимость.

Диссертация Антона Сергеевича Назарова по объёму, уровню выполнения и актуальности полученных результатов полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426).

Антон Сергеевич Назаров, несомненно, заслуживает присвоения степени кандидата химических наук по специальности «1.5.6. – Биотехнология».

Главный научный сотрудник  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук,  
д.х.н., профессор

Татьяна Викторовна Демидкина  
6 октября 2021 г.

119991, Москва  
Ул. Вавилова, д. 32  
E-mail: tvdemidkina@yandex.ru  
Тел. +79160783707

Подпись  
д.х.н., профессора Т.В. Демидкиной  
«Удостоверяю»  
Ученый секретарь ИМБ РАН  
к.в.н.

Александр Анатольевич Бочаров  
6 октября 2021 г.

