

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,**

созданного на базе Федерального государственного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), по диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 27 октября 2021 г. №12

О присуждении **Назарову Антону Сергеевичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата химических наук.

Диссертация «Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов ультравысокопроизводительного скрининга» по специальности 1.5.6 – Биотехнология принята к защите 15.07.2021 г. (протокол № 7) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Назаров Антон Сергеевич, 15 марта 1993 года рождения, в 2015 году окончил Биологическое отделение факультета Естественных наук Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» по программе бакалавриата «Молекулярная биология», в 2017 году окончил Биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» по программе магистратуры «Биохимия», а в 2021 году окончил аспирантуру в Федеральном государственном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время работает в должности инженера-исследователя лаборатории биокатализа отдела пептидно-белковых технологий ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории биокатализа отдела пептидно-белковых технологий ИБХ РАН.

**Научный руководитель** - кандидат химических наук Терехов Станислав Сергеевич, старший научный сотрудник–лаборатории биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии и лаборатории высокопроизводительного скрининга биологических объектов ИБХ РАН.

### **Официальные оппоненты:**

Демидкина Татьяна Викторовна, доктор химических наук, профессор, руководитель лаборатории химических основ биокатализа Федерального государственного бюджетного



учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН);

**Пометун Анастасия Александровна**, доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), г. Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном д.б.н. Яшиным Денисом Владимировичем, главным научным сотрудником лаборатории молекулярной иммуногенетики рака и утвержденном д.б.н., академиком РАН Георгиевым Павлом Георгиевичем, директором ФГБУН Института биологии гена Российской академии указала, что диссертация Назарова Антона Сергеевича является завершенной научно-квалификационной работой, которая по своей новизне, актуальности и достоверности полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям согласно «Положению 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; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор Назаров Антон Сергеевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Соискатель имеет 5 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 3 работы общим объемом 4 печатных листа в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые А.С. Назаров внес основной либо существенный вклад, включают:

1. Terekhov S, Smirnov I, Malakhova M, Samoilo A, Manolov A, **Nazarov A**, Danilov D, Dubiley S, Osterman I, Rubtsova M, Kostyukova E, Ziganshin R, Kornienko M, Vanyushkina A, Bukato O, Ilina E, Vlasov V, Severinov K, Gabibov A, Altman S. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities. PNAS, 115, 38, p. 9551-9556, 2018 Sep 18.
2. Stanislav S. Terekhov\*, Yuliana A. Mokrushina\*, **Anton S. Nazarov\***, Alexander Zlobin\*, Arthur Zalevsky, Gleb Bourenkov, Andrey Golovin, Alexey Belogurov Jr., Ilya A. Osterman, Alexandra A. Kulikova, Vladimir A. Mitkevich, Hua Jane Lou, Benjamin E. Turk, Matthias Wilmanns, Ivan V. Smirnov, Sidney Altman and Alexander G. Gabibov. A kinase bioscavenger provides antibiotic resistance by extremely tight substrate binding. Science Advances, 6, 26, eaaz9861, 2020 Jun 24. (\* - равный вклад авторов).
3. S. Terekhov, **A. Nazarov**, Y. Mokrushina, M. Baranova, N. Potapova, M. Malakhova, E. Ilina, I. Smirnov, A. Gabibov. Deep functional profiling facilitates the evaluation of the antibacterial potential of antibiotic amicoumacin. Antibiotics, 9, 157, 2020 April 2.

#### **На диссертацию поступили отзывы:**

Отзыв официального оппонента д.х.н. профессора **Демидкиной Татьяны Викторовны**.  
Отзыв положительный, содержит следующие замечания:



- Название диссертационной работы считаю неудачным, оно слишком общее.
- Для новых киназы и фосфатазы нужно было привести классификационные номера.
- Определенные в работе значения МИК аминокумацина для ряда бактерий (стр. 65) не сравниваются с опубликованными другими исследователями.
- Названия ферментов (стр. 67, 76, 77, 83, 84) не соответствуют рекомендациям комиссии по классификации и номенклатуре ферментов.
- В списке цитированной литературы названия микроорганизмов не выделены курсивом.

Отзыв официального оппонента д.х.н. **Пометун Анастасии Александровны**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

- В обзоре литературы много внимания уделено платформам для поиска соединений, обладающих антимикробной активностью, а также классам таких соединений. При этом практически нет информации об антибиотике амикумацине, которому посвящена значительная часть экспериментальной работе, хотя это соединение было известно еще с 80-х годов прошлого столетия.
- В разделе «Результаты и их обсуждение» автор предлагает использовать амикумацин для микробиологических и биохимических исследований (с. 62). При этом автор не уделяет должного внимания стабильности этого соединения, хотя этот параметр является важным для применения в такого рода исследованиях.
- Из основного текста работы, а также аннотации и выводов следует, что Am<sub>i</sub> проявляет активность в отношении золотистого стафилококка. При этом, на рисунках 12 и 13 нет *Staphylococcus aureus*, в то время как на рисунке 14 работы *S. aureus* присутствует среди штаммов, МИК к которым составляет менее 1 мкг/мл. Хотелось бы понять, какой именно эксперимент в данной работе доказывает наличие антибиотической активности Am<sub>i</sub> по отношению к репортерной патогенной бактерии *S. aureus*?
- В разделе 3.6 описывается «аланиновый скрининг» киназы Am<sub>i</sub>N и указаны номера остатков, подверженных мутагенезу. Автором установлено, что при замене некоторых остатков наблюдается полная потеря активности. А для других аминокислотных остатков такой эффект не наблюдается. Для упрощения восприятия результатов было бы хорошо представить эти данные в виде таблицы.
- Работа содержит многочисленные опечатки, а также некоторое количество ошибок в написании слов и пунктуации.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:



- Работе не лишена недостатков, однако они касаются ее оформления, а не существа работы. В работе встречаются неудачные выражения и опечатки, но это не умаляет ее достоинств.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области микробиологии, биокатализа и структурного анализа белков, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации – Институте биологии гена – ведутся исследования в области структурной биологии белков, генетики микроорганизмов, а также молекулярных биотехнологий. Официальный оппонент Демидкина Татьяна Викторовна является ведущим специалистом в областях структурной биологии ферментов, биокатализа, а также метаболизма вторичных метаболитов микроорганизмов. Официальный оппонент Пометун Анастасия Александровна также является специалистом в области структурной биологии бактериальных ферментов и метаболических путей микроорганизмов. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был обнаружен и охарактеризован новый штамм *Bacillus pumilus* 124, а также идентифицирован антимикробный агент – амикумацин, который обеспечивает антимикробную активность по отношению к патогенной бактерии *S. aureus*. Диссертантом был проанализирован кластер генов биосинтеза амикумацина, его архитектура и идентифицированы ранее не описанные ферменты AmiN и AmiO. Дальнейшие исследования позволили охарактеризовать их ферментативные свойства, а именно: AmiN обеспечивает резистентность к амикумацину за счет его фосфорилирования, а фосфатаза AmiO отвечает за реактивацию неактивного фосфорилированного амикумацина в процессе его секреции во внеклеточное пространство. Кроме того, диссертантом были изучены кинетические характеристики и структурные особенности киназы AmiN, а также была показана ее высокая специфичность по отношению к амикумацину. Помимо этого, была разработана технология высокопроизводительного персонифицированного скрининга чувствительности бактериальных штаммов к антибиотикам, основанная на использовании микрофлюидной платформы.

**Теоретическая значимость** исследования обоснована тем, что разработанная автором технология глубокого функционального профилирования бактериальных сообществ позволила получить важные данные о новых механизмах антибиотикорезистентности. Детальные исследования открытой автором ранее неизвестной киназы резистентности AmiN позволили обнаружить новое подсемейство AmiN-подобных киназ, входящих в суперсемейство аминокликозидфосфотрансфераз (APH), а их свойства



дают важную информацию для выяснения механизмов действия киназ антибиотикорезистентности и их распространенности среди бактерий.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что диссертантом была показана эффективность использования ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы для поиска биологически активных соединений. Данные о новом механизме резистентности дают возможность в будущем находить кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов в геномах других бактерий на основе гомологии с описанной киназой резистентности AmiN, что позволяет использовать биоинформатические методы для поиска новых антибиотиков *in silico* наряду с микрофлюидным скринингом. Разработанная платформа скрининга чувствительности отдельных штаммов микробиоты к антибиотикам позволяет с высокой производительностью анализировать спектр активности антимикробного соединения, что позволяет значительно быстрее и без использования бактериальных изолятов определять значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов продемонстрирована неоднократно. При анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации.

Личный вклад Назарова Антона Сергеевича в представленную диссертационную работу заключался в проведении ультравысокопроизводительного микрофлюидного скрининга микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя, микробиологических экспериментов с дикими и рекомбинантными штаммами *B. pumilus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* и многими другими. Молекулярное клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантных AmiN и AmiO, исследование биологической функции и биохимических характеристик данных ферментов также проводились диссертантом. Получение кристаллов AmiN с различными лигандами и определение их структуры проводились в сотрудничестве с м.н.с. Ю.А. Мокрушиной из лаборатории биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также с с.н.с. Г.П. Буренковым из Гамбургского подразделения ЕМБЛ. Биоинформатические исследования кластеров генов и бактериальных геномов, а также молекулярное моделирование динамики киназы AmiN проводились совместно с группой д.х.н. А.В. Головина из Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского. Также автор работы занимался обработкой и интерпретацией полученных экспериментальных данных и подготовкой материалов научных публикаций.



В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания и уточняющие вопросы:

1. В названии диссертации фигурирует поиск новых соединений, тем не менее амикумацин уже был открыт ранее. Какие конкретно новые биологически активные соединения были открыты?
2. Каков механизм действия амикумацина?
3. Какие недостатки имеет амикумацин как химическое соединение? Используется ли он в качестве лекарственного препарата?
4. Открытая в данной работе киназа AmiN имеет узкую субстратную специфичность. Проявляет ли данная киназа активность по отношению к не низкомолекулярным соединениям?

Соискатель Назаров Антон Сергеевич ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

1. В ходе данной работы были открыты новые ферменты - киназа AmiN и фосфатаза AmiO, которые инактивируют амикумацин за счет его фосфорилирования и реактивируют за счет дефосфорилирования.
2. Амикумацин является трансляционным ингибитором, механизм ингибирования обусловлен образованием комплекса между Ami, мРНК и 16S рРНК.
3. Была исследована стабильность Ami при различных значениях pH и показана его ограниченная стабильность в щелочных условиях. На данный момент такая ограниченная стабильность Ami препятствует его применению в качестве лекарственного препарата. Тем не менее мы продолжаем работать над повышением стабильности Ami и добились определенных успехов в получении более стабильных к спонтанному гидролизу аналогов.
4. Киназа AmiN обладает протеинкиназной активностью, она является сериновой фосфотрансферазой, но при этом ферментативная активность по отношению к протеинам ниже на более чем 4 порядка, чем к своему природному субстрату Ami.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Назарова А.С. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят существенный вклад в развитие высокотехнологичных методик для поиска и анализа свойств новых антимикробных соединений, что является важным для развития исследований в области биотехнологии и медицины. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Назарова Антона Сергеевича «Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов ультравысокопроизводительного скрининга», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским



диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650, 20.03.2021 г. № 426).

На заседании 27 октября 2021 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по применению ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы для скрининга бактериальных сообществ, за открытие новых ферментов (AmiN и AmiO) и разработку метода персонифицированного скрининга антибиотикорезистентности присудить Назарову Антону Сергеевичу ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 8 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.6 - биотехнология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель  
диссертационного совета

академик РАН, д.х.н. Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

28 октября 2021 г.

