

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии гена Российской академии наук

(ИБГ РАН)

ул. Вавилова, 34/5, Москва, 119334

Телефон: +7 (499) 135-60-89 Факс: +7 (499) 135-41-05,

E-mail: [info@genebiology.ru](mailto:info@genebiology.ru), <http://www.genebiology.ru/>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/КПП 7736020369/773601001

29.09.2021 № 12318-233

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Института биологии  
гена Российской академии наук



Академик П.Г. Георгиев

**Отзыв ведущей организации  
на диссертацию Назарова Антона Сергеевича по теме: «Поиск новых  
биологически активных соединений с помощью подходов  
ультравысокопроизводительного скрининга», представленную на  
соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 1.5.6. – «биотехнология»**

**Актуальность исследования.**

Диссертация Назарова Антона Сергеевича “Поиск новых биологически активных соединений с помощью подходов ультравысокопроизводительного скрининга” посвящена поиску новых антимикробных соединений. Как известно, неуклонный рост числа случаев возникновения резистентности у бактерий ведет к необходимости получения новых антибиотиков, поэтому актуальность данной работы не вызывает сомнений. Данная диссертационная работа посвящена применению новой высокоэффективной микрофлюидной

платформы для анализа образца экзотической микробиоты. В целом, результаты работы автора вносят существенный вклад в понимание механизмов работы и регуляции нового антимикробного соединения.

### **Структура диссертации.**

Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Материал иллюстрирован 40 рисунками и 3 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 102 цитированные работы.

### **Содержание диссертации.**

Во введении автор представляет обоснование важности темы исследований. Обзор литературы содержит сведения, необходимые для понимания работы. В нем описаны различные подходы к поиску новых антибиотиков, известные антибиотики и разрабатываемые в последнее время методы поиска новых соединений с антимикробной активностью. Он написан хорошим языком, с привлечением современных источников и позволяет оценить место данной работы в современной науке.

Раздел Материалы и Методы содержит описание используемых в работе методических процедур. Работа выполнена с использованием самых современных методов исследования и статистических подходов, что позволяет не сомневаться в достоверности полученных результатов.

В разделе Результаты и обсуждение представлены полученные результаты и их анализ. Первая часть посвящена дизайну системы, созданной для анализа способности различных штаммов из ротовой полости медведя снижать жизнеспособность патогенного *S. aureus*. После обнаружения антимикробной активности штамма *B. Pumilus* 124 был проведен анализ его антимикробной активности и выделено новое вещество с антимикробной активностью – амикумацин.

Далее автором с помощью полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа генома был идентифицирован кластер генов биосинтеза амикумацина и выявлено его сходство с кластерами синтеза других

антибиотиков: цвиттермицина, паениламицина, ксенокумацина и колибактина. В кластере генов биосинтеза Ami были обнаружены два ранее не известных фермента AmiN и AmiO. Показано, что киназа AmiN инактивирует Ami в результате его фосфорилирования, в то время как фосфатаза AmiO участвует в последующей реактивации Ami, дефосфорилируя фосфопроизводное Ami. Дальнейшая работа привела к открытию нового подсемейства AmiN-подобных киназ суперсемейства аминогликозид фосфотрансфераз (APH), обеспечивающих резистентность к Ami. В следующей части работы были исследованы ферментативные свойства киназы AmiN, регулирующей активность антибиотика в клетке. Эта часть работы представляется наиболее интересной и выполненной на самом высоком уровне. Проведено биохимическое, кинетическое и структурное исследование киназы AmiN, а также молекулярное моделирование процесса фосфорилирования Ami. Особенно сильное впечатление производит рентгеноструктурный анализ новой киназы, и исследование ее активного центра. В работе продемонстрировано, что для обеспечения протекания реакции фосфорилирования необходимо образование закрытой формы фермента.

Установлено, что реакция фосфорилирования Ami киназой AmiN протекает по диссоциативному механизму, а для обеспечения каталитической активности AmiN необходим один ион  $Mg^{2+}$ . Также изучена субстратная специфичность фермента и показано, что он может фосфорилировать довольно широкий спектр соединений, включая белки.

Выводы сформулированы четко и обоснованно, вытекают из целей исследования. Автореферат автора содержит все необходимые данные о поставленной научной задаче и о ее решении в рамках данной работы.

#### **Научная новизна работы.**

В настоящей работе был впервые проведен скрининг микробиоты ротовой полости сибирского бурого медведя *Ursus arctos collaris* с помощью ультравысокопроизводительной микрофлюидной платформы и обнаружен штамм *Bacillus pumilus* 124, который проявлял наибольшую антимикробную активность по отношению к патогенной бактерии *S. aureus* благодаря

продукции антибиотика амикумаина (Ami). Также автором была разработана платформа глубокого функционального профилирования бактериального сообщества, позволяющая осуществлять персонифицированный скрининг антибиотикорезистентности. Разработанная платформа позволила детализировать спектр активности Ami для отдельных клеток микробиоты.

С помощью биоинформатических методов анализа генома автором был идентифицирован кластер генов биосинтеза Ami, а также определены ранее не охарактеризованные ферменты AmiN и AmiO, которые участвуют в метаболизме амикумаина в бактериальной клетке. Биологическая активность данных ферментов была подтверждена с помощью методов молекулярного клонирования, экспрессии белков и гетерологической продукции. Показано, что киназа AmiN инактивирует Ami в результате его фосфорилирования, в то время как фосфатаза AmiO участвует в последующей реактивации Ami дефосфорилируя фосфопроизводное Ami.

На основании данных о гомологии было открыто новое подсемейство AmiN-подобных киназ суперсемейства аминокликозид фосфотрансфераз (APH), обеспечивающих резистентность к Ami. Было проведено биохимическое, кинетическое и структурное исследование киназы AmiN, а также молекулярное моделирование процесса фосфорилирования Ami.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Данная работа показывает, что ультравысокопроизводительная микрофлюидная платформа является высоко эффективным инструментом поиска новых антимикробных соединений среди представителей различных экзотических бактериальных сообществ. Глубокое функциональное профилирование таких образцов микробиоты дает важные данные о новых механизмах резистентности, а также механизмов продукции вторичных метаболитов бактериальными клетками. Таким образом, автором разработана высокотехнологичная методика для поиска новых антимикробных соединений и анализа сложных гетерогенных популяций микроорганизмов, необходимая для современной медицины, в которой с начала 1980-х годов заметно снижение темпов разработки новых эффективных антибиотиков. Микрофлюидная

ультравысокопроизводительная платформа является важным инструментом поиска антибиотиков, способных противостоять быстро распространяющимся мультирезистентным бактериям.

#### **Замечания по работе.**

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

#### **Заключение.**

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», является завершенной научно-квалификационной работой, которая по своей новизне, актуальности и достоверности полностью соответствует критериям (пп. 9-14), 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), а ее автор Назаров Антон Сергеевич заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.6. – «биотехнология».

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории молекулярной иммуногенетики рака (Протокол № 1 дата 01.09.2021).

Отзыв подготовлен старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биологии гена Российской академии наук, доктором биологических наук Яшиным Денисом Владимировичем.

Яшин Денис Владимирович, д.б.н. по специальности  
03.01.03 молекулярная биология, г. Москва ул. Вавилова 34/5  
тел. 8-916-9570938 эл. почта: yashin\_co@mail.ru

