

## ОТЗЫВ

**Официального оппонента на диссертационную работу Макарова Геннадия Ивановича «Молекулярно-динамическое исследование рибосомного туннеля и его комплексов с антибиотиками», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.**

Синтез белков, за который отвечает рибосома (комплекс из нескольких молекул РНК и множества белков), является одним из жизненно важных процессов в клетке и его остановка приводит к клеточной смерти. Современный уровень представлений о процессе синтеза белка в рибосоме основан на исследованиях сотен коллективов ученых в разных странах в течение 60 лет. Многие этапы этого пути отмечены Нобелевскими премиями, в том числе за определение последовательности нуклеотидов первой тРНК, расшифровку генетического кода (1968 г.), определение последовательности нуклеотидов в рибосомной 5S РНК (1980 г.), открытие каталитических свойств РНК (1989 г.) и за «исследование структуры и функций рибосомы» (2009 г.). При этом понимание функционирования рибосомы важно не только для научного постижения жизни, а направлено, в том числе, и на решение целого ряда практических задач. Рибосома является мишенью воздействия самой большой группы (в рамках классификации антибиотиков по механизму действия) антибиотиков, различных по своей химической структуре. Известно, что бактерии способны приспосабливаться к губительному для них действию антибиотиков, приобретая к ним устойчивость, что стимулирует поиск новых антибиотиков. Детальное изучение структуры рибосом, таким образом, помогает конструировать более эффективные и селективные антибиотики, необходимые для лечения многих серьезных заболеваний.

С этой точки зрения не вызывают сомнения актуальность и практическая значимость диссертационной работы Макарова Геннадия Ивановича, направленной на исследование принципов и механизмов работы рибосомы в плане образования комплексов рибосомного туннеля с антибиотиками. Рибосомный туннель является динамической системой, реагирующей на проходящие по нему пептиды, связывающиеся с ним антибиотики и др. и потому для изучения принципов и механизмов работы рибосомного туннеля важно исследование протекающих в нем процессов в динамике. В то же время, существующие традиционные экспериментальные биохимические методы изучения рибосомы не вполне справляются с этой задачей, поскольку исследуют рибосому в различных ее статичных



состояниях. Поставленная диссертантом задача решена путем применения одного наиболее мощных вычислительных методов, эффективно используемых для моделирования физических и биологических систем, - метода молекулярной динамики. Использование молекулярного моделирования позволило детально изучить динамические свойства рибосомы, а также свойства её комплексов с антибиотиками и механизмы взаимодействия с антибиотиками на уровне движения отдельных нуклеотидных и аминокислотных остатков.

Диссертационная работа Макарова Г.И. изложена по традиционному плану на 161 стр. и состоит из: введения, литературного обзора, основной части – обсуждения результатов, экспериментальной части, приложения и списка цитируемой литературы – 232 ссылки.

Литературный обзор диссертации состоит из нескольких глав и посвящен строению и функциям рибосомы и рибосомного туннеля, общим сведениям о методе молекулярной динамики и его применении для исследования рибосом. Кроме того, подробно рассмотрены и обобщены результаты моделирования данные рибосомы методом молекулярной динамики, имеющие непосредственно отношение к работе диссертанта и посвященные изучению связывания рибосомой антибиотиков различных классов. Таким образом, литературный обзор, подготовленный Макаровым Г.И., вводит все понятия, необходимые для рассмотрения моделирования рибосомного туннеля и его комплексов с антибиотиками и отражает современный уровень исследований в этой области. Анализ литературы проведен на высоком уровне и дает адекватное представление о состоянии дел по проблематике работы. Материал хорошо структурирован и четко изложен, охарактеризованные понятия и концепции формируют эффективный инструментарий для дальнейшего обсуждения диссертационной работы. Это позволило диссертанту положить основу дальнейших исследований, направленных на исследование рибосомного туннеля и его комплексов с антибиотиками методом молекулярной динамики. В целом, литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации Макарова Г.И. в области биоорганической химии.

В разделе «Результаты и их обсуждение» представлен логически структурированный цикл экспериментов, начинающийся с моделирования структуры комплекса тилозина с большой субъединицей рибосомы *E. coli* и описания связывания тилозина с физико-химических позиций. Полученные результаты побудили автора продолжить исследования в этой области, что в первую очередь потребовало моделирования рибосомного туннеля. Рибосомный туннель представляет собой один из важнейших функциональных элементов рибосомы, отвечающий за вывод вновь синтезированной пептидной цепи из пептидилтрансферазного центра, образование вторичных структур пептидной цепью и регуляцию трансляции. Для изучения динамики нуклеотидных остатков, составляющих



рибосомный туннель, автором было проведено молекулярно-динамическое моделирование центрального фрагмента большой субъединицы рибосомы *E. coli*, включающей весь пептидилтрансферазный центр и рибосомный туннель. При анализе траекторий моделируемого фрагмента рибосомы обнаружены конформационные переходы, в которых участвовали нуклеотидные остатки пептидилтрансферазного центра и рибосомного туннеля. Необходимо отметить, что автор проводит анализ полученных результатов конформационных переходов нуклеотидных остатков в свете имеющихся литературных данных, что свидетельствует о его высокой квалификации и эрудиции.

Следующим этапом исследований стало изучение механизма устойчивости к антибиотикам, вызываемой  $C^{2,8}$ -диметилирование остатка A2503 23S рибосомы. С этой целью автор исследует сначала комплексы антибиотиков (клиндамицина, линезолида и хлорамфеникола) с большой субъединицей рибосомы *E. coli*, содержащей как монометилированный остаток  $m^2A2503$ , отвечающей структуре «чувствительной» рибосомы, так и диметилированный остаток  $m^2m^8A2503$ , что соответствует структуре рибосомы устойчивых бактерий. Полученные результаты молекулярно-динамического моделирования отобразили экспериментально наблюдаемую устойчивость рибосомы к изучаемым антибиотикам и позволили выдвинуть предположение о механизме возникновения устойчивости рибосомы к оксазолидинонам, линкозамидам и амфениколам, вызываемом  $C^{2,8}$ -диметилированием гетероциклического основания A2503. Предположительно, введение C8-метильной группы приводит к упорядочиванию стэкинг-взаимодействий между основаниями A2503 и A2059, которое требует поворота этих оснований. Этот поворот приводит к схлопыванию оснований A2058 и A2059 с образованием сплошной стопки оснований G2056-G2057-A2058-F2059- $m^2m^8A2503$ , что обеспечивает энергетический выигрыш и разрушает стэкинг-взаимодействие A2503 с G2061, потеря которого частично компенсируется уходом  $C^8$ -метильной группы  $m^2m^8A2503$  из полярного окружения к гидрофобной поверхности G2061. Подобные изменения конформаций нескольких остатков препятствует связыванию с антибиотиками и понижает сродство рибосомы к ним за счет возмущению сети водородных связей, удерживающих пространственную структуру рибосомы, приводя к изменению конформации оснований, в том числе удалённых от A2503. Важнейшим выводом этой части исследования является установленный факт того, что модификация нуклеотидного остатка может влиять не только на локальную пространственную структуру рибосомы, но через сеть нековалентных взаимодействий вызывать более глобальные перестройки пространственной структуры биополимера.



Продолжение работы Макарова Г.И. связано с исследованием ранее полученных в лаборатории альдегидных производных эритромицина (3'-N-(2-оксоэтил)-3'-N-дезметилэритромицина (I) и 3'-N-(1-метил-3-оксопропил)-3'-N-дезметилэритромицина (II)) и анализ их взаимодействий с рибосомным туннелем. Полученные результаты для свидетельствовали о более высокой энергии взаимодействия с рибосомой производного I в сравнении с производным II, что противоречило полученным экспериментальным данным по определению констант диссоциации комплексов I или II с рибосомой *E.coli* и способности соединений подавлять синтез люциферазы *Renilla luciferase in vitro*. Полученное противоречие расчетных и экспериментальных данных объяснено за счет визуального анализа и расчета энергий нековалентных взаимодействий, которые позволили обнаружить в случае соединения II совместную координацию карбонильной группы 1-метил-3-оксопропильного фрагмента и фосфатных групп нуклеотидных остатков с ионом магния. Таким образом, установлено, что соединение II, помимо водородных связей и гидрофобных контактов, участвует также в еще одном прочном взаимодействии, что приводило к более сильному удержанию его в сайте связывания.

Заключительным этапом исследований Макарова Г.И. в рамках диссертационной работы стало изучение производных 5-О-микаминозилтилонолида, этерифицированных N-Вос-аминокислотами по 23 положению, которое позволило объяснить наблюдаемые для серии этих соединений соотношение активностей по подавлению синтеза люциферазы светлячков рибосомой *E. coli* в бесклеточной системе.

В разделе «Методы» представлен инструментарий, использованный Макаровым Г.И. для решения задач, поставленных в рамках диссертационной работы. Все расчеты молекулярной динамики и анализ полученных траекторий проводили с использованием программного пакета GROMACS версий 4.5.4, 4.6.5 и 5.0.1 и силового поля parm99sb. По мнению оппонента, применение автором этих инструментов молекулярного моделирования адекватно поставленной задаче изучения механизмов взаимодействия рибосомы (рибосомного туннеля) с антибиотиками и соответствует современному уровню исследований в этой области. В целом раздел «методы» в сочетании с представленными результатами свидетельствуют о высокой квалификации Макарова Г.И. в области биоорганической химии, в частности, расчетных методов моделирования и метода молекулярной динамики.

Форма и порядок изложения результатов исследований (таблицы, графический материал и список литературных источников) и выводы не вызывают возражений – материал подан логично и ясно. Результаты каждого раздела диссертационной работы дополняют и



логически развивают положения, установленные автором ранее. Сформулированные выводы обоснованы, логично вытекают из полученных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания:

1) Небольшое замечание оппонента вызывает то, что автор оптимизирует трехмерные структуры и молекулярные электростатические потенциалы квантово-химическими расчетами методом Хартри-Фока в базисе 6-31 G\*. Поскольку используемые в ходе исследований структуры являются сопряжёнными, в обычной практике квантово-химических расчётов подобных структур принято использовать методы теории функционала плотности: например BLYP, B3LYP в том же базисе.

2) По мнению оппонента, результаты, представленные диссертантом в части, посвященной изучению N-Вос-аминокислотных производных 5-О-микаминозилтилонолида, не явно отражены в выводах диссертации и могли бы быть сформулированы более четко.

3) Диссертация, в целом, написана очень грамотно и практически не содержит опечаток, однако, рецензенту удалось обнаружить ряд неудачных выражений, например, на стр. 75 – «аминовая группа», и неточность выражения на стр. 91. «к 80 не приводящий».

Отмеченные погрешности не изменяют общего прекрасного впечатления от рассматриваемой работы, указанные недостатки носят не принципиальный характер, и диссертация Макарова Г.И., безусловно, заслуживает высокой оценки.

Результаты диссертации представлены автором научному сообществу на 4 конгрессах и конференциях, включая международные, основные положения и выводы опубликованы в трех статьях в журналах, рекомендованных ВАК. Содержание диссертационной работы в полной мере соответствует специальности 02.00.10 – биорганическая химия. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

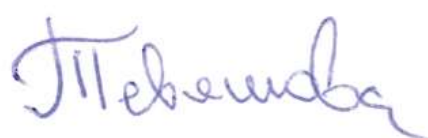
Макаровым Г.И. выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задач, имеющей существенное значение для развития биорганической химии: проведено исследование рибосомного туннеля и его комплексов с антибиотиками методом молекулярной динамики.

Таким образом, диссертационная работа Макарова Г.И. «Молекулярно-динамическое исследование рибосомного туннеля и его комплексов с антибиотиками» по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности темы, объему проведенных исследований,



научной новизне и практической значимости является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня. Диссертационная работа Макарова Г.И. безусловно, удовлетворяет требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям и изложенным в п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723), а ее автор – Макаров Г.И. заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

Доктор химических наук



Тевяшова А.Н.

Ведущий научный сотрудник лаборатории  
Химической трансформации антибиотиков ФГБНУ  
«Научно-исследовательский институт по изысканию  
новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе» (ФГБНУ «НИИНА»), лаборатория химической трансформации антибиотиков

Почтовый адрес: 119021, г. Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11, стр. 1

Телефон: +7-499-246-06-36

Адрес электронной почты: chulis@mail.ru

*Подпись в.н.с., д.х.н. Тевяшовой А.Н. заверяю*

08 сентября 2016 г.

и.о. ученого секретаря ФГБНУ «НИИНА»

к.х.н.



Кисиль О.В.