

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»**

Исследования процессов биосинтеза белка и его регуляции являются одними из наиболее значимых в физико-химической биологии. Биосинтез белка в клетках организмов происходит на сложных РНК-белковых органеллах – рибосомах, которые содержат три больших рибосомных рРНК и более 50 различных рибосомных белков. Определение структур бактериальных рибосом и рибосомных субчастиц в начале 2000-х годов методом рентгеноструктурного анализа положило возможность изучения этого процесса на полноатомных моделях. Это важнейшее научное достижение оценено Нобелевской премией по химии 2009 г. и стало существенной вехой в дальнейшем исследовании синтеза белков в клетках. Однако модель рибосомы является статичным объектом, для создания полноценной картины процесса биосинтеза белка необходим кропотливый труд по изучению взаимодействия центрального объекта (рибосомы) с окружающего его белковыми факторами, описания химического процесса переноса доставляемой аминокислоты к растущей полипептидной цепи и т.п. Важным фундаментальным направлением, несущим также и важное прикладное значение, является исследование воздействия на процесс биосинтеза белка различных лигандов, в том числе антибиотиков, которые «выключают» синтез белков на бактериальных рибосомах и, следовательно, подавляют рост бактерий.

В диссертационной работе Г.И. Макарова для исследования взаимодействия антибиотиков с рибосомой использован современный метод динамического исследования процессов взаимодействия различных молекул – метод молекулярной динамики (МД). Данный метод позволил скомбинировать статичные данные по структуре рибосомы с функциональными биохимическими данными, и, таким образом, получить динамическую модель поведения выбранных компонентов сложной системы на атомарном уровне с оценкой возможного влияния на неё вносимых воздействий или молекул. Непосредственной целью диссертационной работы стало молекулярно-динамическое исследование рибосомного туннеля и связывающихся в нем макролидных антибиотиков. Поставленная в данной работе задача изучения механизма устойчивости бактериальной

рибосомы к антибактериальным препаратам несомненно является актуальной и имеет практическую значимость.

Подготовленная Г. И Макаровым диссертация отражает большой объем проведенной им работы по моделированию структуры 50S рибосомной субчастицы и её области, по которому движется растущая (синтезируемая) полипептидная цепь белка, а также моделирование её комплексов с антибиотиками эритромицином, линезолидом, клиндамицином, хлорамфениколом, тилозином и рядом их производных. Проведенные исследования показали наличие сложных обратимых конформационных переходов рРНК при связывании лигандов, сопровождающихся перестройкой сети стэкинг-взаимодействий и водородных связей и могущих аллостерически связывать удаленные друг от друга области рРНК. Показано, что при моделировании необходимо учитывать координированные ионы магния, которые могут вносить значительный вклад во взаимодействие лиганда с рибосомой. Результаты проведенных исследований позволяют сделать однозначные выводы о причине возникновения устойчивости к антибиотикам эритромицинового ряда при модификация определенных нуклеотидов 23S рРНК и возможных химических модификациях антибиотиков для преодоления этой устойчивости. Представленные материалы диссертации свидетельствуют об успешном достижении поставленной цели исследования.

Диссертационная работа Г.И Макарова включает все необходимые разделы: введение, обзор литературы, результаты и их обсуждения, методы, выводы и список литературы. Работа изложена на 158 страницах, содержит 48 рисунков и 6 таблиц, большое число математических формул. В библиографии диссертации представлено 232 источника.

Обзор литературы содержит несколько глав: строение и функционирование рибосомы, введение в метод молекулярной динамики, применение этого метода для исследования функционирования рибосомы, моделирование рибосомных антибиотиков, связанных с рибосомой.

Первая глава обзора литературы посвящена краткому описанию строения рибосомы и её морфологии, содержит подробное описание отдельных, наиболее важных с точки зрения функционирования, областей. Значительно место уделено анализу структуры пептидилтрансферазного центра рибосомы и механизму происходящей там пептидилтрансферазной реакции. Подчеркнута роль рибосомной РНК в функционировании рибосомы. Специальная глава уделена описанию рибосомного туннеля, который является областью исследования в представленной работе. Глава

хорошо проиллюстрирована и позволяет донести даже до неподготовленного читателя наиболее важную информацию об объекте исследования.

Вторая глава обзора посвящена обзору современного состояния молекулярной динамики как метода. Приводятся его основы в целом и проводится сравнительный анализ основных вариантов его применения. Текст сопровождается математическими формулами, позволяющими понять принципы и особенности каждого из вариантов метода молекулярной динамики, их достоинства и недостатки.

Отдельная глава обзора литературы уделена текущим достижениям исследования рибосомы с помощью молекулярной динамики. Приведены данные по моделированию распознавания тРНК рибосомой и участию в этом процессе белковых факторов, моделированию транслокации мРНК и тРНК, расчету влияния мутаций нуклеотидов рРНК на устойчивость бактериальной рибосомы к антибиотикам. Показано текущее состояние исследований связывания макролидных антибиотиков с рРНК и рибосомными белками в области рибосомного туннеля; приводятся сведения по исследованию взаимодействия ряда других антибиотиков с рибосомой молекулярной динамикой.

Обзор литературы в работе Г. И Макарова проведен на хорошем уровне и дает адекватное представление об объекте исследования и используемом методе исследования. Рассмотрено значительное число публикаций (более 150), включая результаты исследований последних лет. Материал хорошо структурирован и иллюстрирован, изложен четко, приведенные понятия и методологии позволяют эффективно разобраться в результатах диссертационной работы. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации автора не только в области биоорганической химии, но и по смежным с ней областям молекулярной биологии.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает большой объём экспериментальных данных по проведённым автором расчётов относительно комплексов антибиотиков эритромицинового ряда и области рибосомного туннеля. Г. И Макаров совершенно логично взял для расчётов кубический фрагмент большой рибосомной субчастицы, включающий в себя пептидилтрансферазный центр и рибосомный туннель. Некоторые нуклеотиды рРНК были модифицированы для соответствия природной последовательности. Модель предварительно подвергнута МД-уточнению и сверена с экспериментально полученными вариантами структуры данной области рибосомы. Следует отметить, что описание в методе МД лигандов, таких как модифицированные нуклеотиды и антибиотики, представляет собой достаточно трудоёмкую задачу, о чём автор скромно умолчал. Полученная модель послужила основой дальнейших расчётов по моделированию взаимодействия исследуемых лигандов с атомами, составляющими

поверхность рибосомного туннеля. Это позволило соискателю получить целый ряд оригинальных данных по взаимодействию антибиотиков с внутренней поверхностью рибосомного туннеля и показать, что величина их связывания в первую очередь определяется прочностью водородных связей, образуемых ими со стенками рибосомного туннеля. Впервые расчетным путём показана необходимость учёта ионов магния, связанных с рРНК, при расчёте сродства и стабильности взаимодействующих с рибосомой лигандов. Результаты показали, что в данной области рибосомы возможны сложные обратимые конформационные переходы с перестройкой сети стэкинг-взаимодействий и водородных связей, которые могут аллостерически связывать удаленные друг от друга функционально важные области рРНК. Показано, что модификации рРНК могут подавлять связывание антибиотиков не только создавая стерические затруднения или прямо блокируя доноры и акцепторы водородных связей, но и провоцируя изменения пространственной структуры РНК (аллостерически).

Полученные результаты не только интересны с точки зрения фундаментальных исследований функционирования рибосомы и влияния на процесс биосинтеза белка различных лигандов, но имеет практическое применение. Моделирование их взаимодействий с заданной областью рибосомы позволяет исследовать влияние различных вариантов антибиотиков на изменение структуры мишени, например, при возникновении устойчивости к конкретным антибиотикам, таким образом предлагая новые варианты антибиотиков, преодолевающих резистентность бактерий к исходным лекарственным средствам.

Поскольку раздел «Результаты и обсуждение» включает большой методический материал, то в лаконично написанном разделе «Материалы и методы» представлены только основные сведения по моделируемой системе, условиям моделирования и анализу получаемых результатов.

Материалы исследования логично и последовательно изложены в подготовленной диссертации и ее автореферате. Использованный при обработке экспериментальных данных математический аппарат обеспечивает достоверность интерпретации результатов исследования. Формулируемые выводы обоснованы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания. Так, можно привести небольшие погрешности и неточности в обзоре литературы, например:

- На стр. 10 указано, что «Первая структура рибосомы, полученная этим (крио-ЭМ) методом, относится к 2003 г.». На самом деле, структуры рибосомы по крио-ЭМ были получены задолго до 2003 г., например, до 2000 г. были получены структуры с разрешением 20-25Å, которые неплохо описывали форму рибосом.
- На стр. 24 при обсуждении принятия спиральной конформации растущей белковой цепи упущено, что такая конформация полипептида была предсказана теоретически в работах Спирина, Лима и Каявы в 1984-85 гг.

Упущением, на мой взгляд, является представление многих результатов по расчётным данным только в виде диаграмм или таблиц расстояний между атомами. Такие результаты можно (хотя и достаточно сложно) представлять в виде 2D или 3D схем, таких как на рис. 3.1 (стр. 76) или рис. 3.4 (стр. 84).

Вышеизложенные соображения имеют незначительный характер, не влияют на общую значимость полученных результатов и обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают её общую положительную оценку.

Результаты работы представлены на четырёх российских и международных конференциях; основные положения и выводы опубликованы в трёх статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ. В виде публикаций и докладов представлены все результаты диссертации. 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.

Г. И Макаровым выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития биорганической химии: представлены результаты молекулярно-динамического исследования рибосомного туннеля и его комплексов с рядом макролидных антибиотиков.

Диссертация Г. И Макарова по актуальности темы, объёму проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого теоретического и экспериментального уровня и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям и изложенным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07 2014 г. №723), а её автор, безусловно,

заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия.

Кандидат химических наук,
заместитель директора по науке
Института белка РАН

А. Д. Никулин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук.

Почтовый адрес: Институт белка РАН, ул. Институтская, д.4,
г. Пущино, Московская обл., 142290, Россия.

Телефон: (4967)318-425.

Адрес электронной почты: nikulina@vega.protres.ru

Подпись А. Д. Никулина заверяю:

Учёный секретарь ИБ РАН

к.б.н.



Е.Ю.Никонова

07 сентября 2016 г.