



ФАНО РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, д. 2
Тел. (499)196-0000, Факс (499)196-0221, www.img.ras.ru, E-mail: img@img.ras.ru
ИНН/КПП 7734021670/773401001, ОКПО 04683332, ОГРН 1027739480955

26.11.19 № 13318/384

УТВЕРЖДАЮ

На № _____

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
молекулярной генетики Российской академии
наук, член-корреспондент РАН



С.В. Костров

2019 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу соискателя РУДАКОВОЙ Натальи Николаевны

**«Экспрессия генов и структурно-функциональный анализ
аминогликозидтрансфераз *Streptomyces rimosus*», представленной на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика**

Актуальность исследования

Диссертационная работа Рудаковой Н.Н. посвящена изучению аминогликозидтрансфераз штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. Среди всех известных механизмов устойчивости к аминогликозидам, модификация ферментами является наиболее распространенным. В связи с этим, всестороннее изучение аминогликозидтрансфераз, осуществляющих химическую модификацию аминогликозидов, является важной и актуальной задачей, позволяющей развивать подходы, применяемые для преодоления резистентности бактерий к аминогликозидам. Сведения о структурно-функциональных особенностях аминогликозидтрансфераз может

быть использовано для разработки лекарственных препаратов, ингибирующих данные ферменты.

Научная новизна и практическая ценность исследований

В ходе исследования Рудаковой Н.Н. был идентифицирован и биохимически охарактеризован новый ген аминогликозидтрансферазы *aph(3'')-Id*, кодирующий стрептомицин фосфотрансферазу, и впервые показано, что представители аминогликозидфосфотрансфераз способны осуществлять автофосфорилирование, что сближает два класса ферментов: протеинкиназы и аминогликозидфосфотрансферазы.

Установлены трехмерные структуры белка *Aph(3'')-Id S. rimosus* ATCC 10970 в апоформе и в комплексе со стрептомицином и АДФ. Для ферментов подсемейства *Aph(3'')* такие структуры получены впервые. Полученные структуры могут быть использованы для поиска ингибиторов аминогликозидфосфотрансфераз, что важно для борьбы с устойчивостью бактерий к антибиотикам.

Рудаковой Н.Н. удалось выявить четыре гена аминогликозидтрансфераз, белковые продукты которых обеспечивают устойчивость штамма *S. rimosus* ATCC 10970 к широкому спектру аминогликозидных антибиотиков. Работа Рудаковой Н.Н. расширяет имеющиеся данные о разнообразии и свойствах аминогликозидфосфотрансфераз.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Рудаковой Н.Н. написана по традиционному плану, изложена на 154 страницах и содержит введение, обзор литературы, экспериментальную часть, включающую описание материалов и методов, использованных в работе, результатов и их обсуждения, заключение, выводы, список литературы, включающий 225 источников и три приложения. Полученные результаты иллюстрированы 43 рисунками и 23 таблицами.

Во введении сформулированы актуальность, цель и задачи работы, а также ее теоретическая и практическая значимость и научная новизна.

В диссертации представлен обзор литературных данных, о резистоме бактерий рода *Streptomyces*, а также сведений, касающихся аминогликозидных антибиотиков и основных свойствах различных семейств аминогликозидтрансфераз – ферментов,

модифицирующих амингликозиды и обеспечивающих устойчивость бактерий к этому классу антибиотиков.

Глава «Материалы и методы» содержит описание методов генетики, биохимии, микробиологии и биоинформатики, применявшихся при выполнении работы, включая методы культивирования бактерий, изучения экспрессии генов, фосфорилирования и автофосфорилирования аминогликозидтрансфераз.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из 7 разделов. В первом разделе описаны результаты сравнения устойчивости к различным аминогликозидам *S. rimosus* ATCC 10970 и модельного штамма *S. lividans* 66, подтверждающие полученные ранее данные, что штамм *S. rimosus* более устойчив к аминогликозидам. Во втором разделе приведены данные биоинформатического анализа аминогликозидфосфотрансфераз *S. rimosus* ATCC 10970, в результате которого было выявлено 14 генов, три из которых, *aphSR5* (*aphVIII*), *aphSR3* и *aphSR2*, были отнесены к известным подсемействам. Третий раздел описывает изучение ранее неизвестной стрептомицинофосфотрансферазы Aph(3'')-Id, обнаруженной в штамме *S. rimosus* ATCC 10970. Ген *aph(3'')-Id* был клонирован в *E. coli*. Выявлена способность аминогликозид-фосфотрансферазы Aph(3'')-Id к автофосфорилированию *in vitro*, что ранее было не описано для белков семейства аминогликозид-модифицирующих ферментов бактерий. Впервые для аминогликозидфосфотрансфераз подсемейства Aph(3'') получены трехмерные структуры на примере белка Aph(3'')-Id из штамма *S. rimosus* ATCC 10970 в апо-форме и в комплексе со стрептомицином и АДФ. В четвертом разделе описано изучение аминогликозидфосфотрансферазы AphSR2 и показана зависимость устойчивости к антибиотикам от фосфорилирования данного фермента серин-треониновыми протеинкиназами. В пятом разделе описываются результаты клонирования в *Escherichia coli* и изучения остальных 11 *aph*-генов *S. rimosus*. Показано, что штамм *S. rimosus* ATCC 10970 устойчив к большинству аминогликозидных антибиотиков, однако, в ходе исследования только для трех из 14 генов аминогликозидфосфотрансфераз, имеющихся у данного штамма – *aph(3')-VIII*, *aph(3'')-Id* и *aphSR2*, было установлено, что они обеспечивают устойчивость к антибиотикам. В шестом разделе приведены результаты изучения экспрессии генов резистама *S. rimosus* ATCC 10970 при индукции аминогликозидами в субингибирующих концентрациях. Транскрипционный анализ генов резистама *S. rimosus* ATCC 10970 показал, что стрептомицин и канамицин не индуцируют экспрессию генов аминогликозидфосфотрансфераз данного штамма, однако стрептомицин индуцировал экспрессию транскрипционного регулятора *tetR*, что может

указывать на возможность активации экспрессии протонных помп, обеспечивающих активный транспорт антибиотиков из клетки. В седьмом разделе описаны свойства других генов, обуславливающих устойчивость штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидным антибиотикам, в частности, ацетилтрансферазы *aacSR*. Установлено, что экспрессия гена *aacSR* обеспечивает устойчивость клеток *E. coli* к широкому спектру аминогликозидов, таких как неомицин, гентамицин, тобрамицин, сизомицин, нетилмицин, изепамицин и паромомицин.

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 5 тезисов участия на отечественных и международных конференциях.

Работа Рудаковой Н.Н. выполнена на хорошем научно-методическом уровне. Существенных недостатков у рассмотренной работы не выявлено, однако к ней имеется ряд небольших замечаний и вопросов. На рисунке с изображением трехмерных структур белка Aph(3'')-Id следовало бы стрелками указать местоположение стрептомицина и АДФ в комплексе с белком и области, в которой происходит конформационное изменение. В Заключение (стр. 115) автору не удалось четко сформулировать полученные результаты. Поэтому при прочтении создается впечатление, что клонирование в *E. coli* гена *pkSR1* придает устойчивость к неомицину и гигромицину, хотя на самом деле данный ген серинтреониновой протеинкиназы в отсутствие гена *aphSR2* не влияет на устойчивость к неомицину и даже слегка увеличивает чувствительность к гигромицину, а при совместной экспрессии увеличивает устойчивость только к неомицину.

Остается неясным, что автор подразумевает, обращая внимание читателя на то, что транскрипция генов *pkSR1* и *aphSR2* происходит в том же направлении, поскольку из приведенной молекулярно-генетической карты района ясно, что эти два гена, вероятнее всего, транскрибируются с разных промоторов.

Кроме того непонятно, что автор имеет в виду, когда пишет, что «В процессе изучения Aph данного штамма установлен новый механизм модуляции активности фермента посредством автофосфорилирования...», тогда как влияние автофосфорилирования на активность фермента автором не изучалась.

В целом диссертационная работа Рудаковой Н.Н., представленная на соискание ученой степени кандидата наук, является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей всем требованиям, представленным в «Положении о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением правительства РФ от

24.09.2013 №824), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Рудаковой Н.Н. «Экспрессия генов и структурно-функциональный анализ аминокликозидтрансфераз *Streptomyces rimosus*» рассмотрен, обсужден и утвержден на научном семинаре отдела Молекулярной генетики клетки (ОМГК) ИМГ РАН 6 ноября 2019 года. Отзыв составлен 13 ноября 2019 года Заведующей сектором анализа и хранения микроорганизмов ОМГК ИМГ РАН, д.б.н. (специальность 03.02.07 – генетика) Петровой Майей Александровной.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН).

Адрес: 123182 Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

Телефон: +7-499-196-00-00, +7-499-196-00-06

Адрес электронной почты: img@img.ras.ru, **Веб сайт:** <https://img.ras.ru/ru>.

Зав. сектора анализа и хранения
микроорганизмов ИМГ РАН, д.б.н.



Петрова Майя Александровна

подпись

Ученый секретарь ИМГ РАН, к. б.н.





Андреева Людмила Евгеньевна