

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.214.01 НА
БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ ИМ. Н.И.
ВАВИЛОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 19.12.2019 протокол № 14

О присуждении Рудаковой Наталье Николаевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Экспрессия генов и структурно-функциональный анализ аминокликозидтрансфераз *Streptomyces rimosus*» по специальности 03.02.07 – генетика принята к защите «17» октября 2019 г., протокол № 8, диссертационным советом Д 002.214.01. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3, приказ Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2014.

Соискатель Рудакова Наталья Николаевна, 1992 года рождения, в 2015 году окончила Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности «микробиология».

Для подготовки диссертации на соискание ученой степени кандидата наук и сдачи кандидатских экзаменов, с 2015 по настоящее время обучается в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук. Научный руководитель диссертационной работы – Даниленко Валерий Николаевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов ИОГен РАН.

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано 08 октября 2019 года Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Диссертация Рудаковой Натальи Николаевны выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

С 2015 года по настоящее время Рудакова Н.Н. работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук в лаборатории генетики микроорганизмов в должности младшего научного сотрудника.

Официальные оппоненты:

Тренин Алексей Сергеевич - доктор биологических наук (специальность 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики), заведующий лабораторией разработки методов поиска биологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», г. Москва

Воейкова Татьяна Александровна - кандидат биологических наук, (специальность 03.02.07 – генетика), главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика), г. Москва

Официальные оппоненты дали положительные отзывы. Высказаны незначительные замечания и комментарии, относящиеся скорее к оформлению работы. Ряд замечаний носят рекомендательный характер, не снижают значения представленных в диссертации результатов. Ответы на все замечания и комментарии представлены в стенограмме заседания.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Институт молекулярной генетики" Российской академии наук (ИМГ РАН), г. Москва, в своем положительном заключении, подписанным Петровой Майей Александровной, доктором биологических

наук по специальности – 03.02.07 генетика, заведующим сектором анализа и хранения микроорганизмов ИМГ РАН, указано, что диссертационная работа по своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов полностью соответствует всем требованиям ВАК Минобрнауки РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация является законченной квалификационной работой, выполненной на актуальную тему на высоком методическом уровне. Научная и практическая значимость не вызывает сомнений. Диссертация в целом не вызывает серьезных замечаний. Ответ на отзыв представлен в стенограмме заседания.

Соискатель имеет 5 публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, а также 5 тезисов докладов, представленных на всероссийских и международных конференциях. Наиболее значительные из них индексируются в базе Web of Science.

Публикации в научных журналах:

1. Boyko K.M., Gorbacheva M.A., Korzhenevskiy D.A., Alekseeva M.G., Mavletova D.A., Zakharevich N.V., Elizarov S.M., Rudakova N.N., Danilenko V.N., Popov V.O. Structural characterization of the novel aminoglycoside phosphotransferase AphVIII from *Streptomyces rimosus* with enzymatic activity modulated by phosphorylation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, V. 477, № 4, P. 595-601. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.097.

2. Рудакова Н.Н., Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы *Streptomyces rimosus*: структура, функции, вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. // *Проблемы медицинской микологии*, 2016, Т. 18, № 2, стр. 109.

3. Алексеева М.Г., Рудакова Н.Н., Захаревич Н.В., Мавлетова Д.А., Бойко К.М., Николаева А.Ю., Корженевский Д.А., Даниленко В.Н. Новый ген аминогликозидфосфотрансферазы aph(3'')-Id из *Streptomyces rimosus* ATCC 10970, кодирующий устойчивость к стрептомицину. // *Генетика*, 2018, Т.54, № 10, с. 1–5.

4. Рудакова Н.Н., Алексеева М.Г., Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Изучение распространения, структуры и функций аминогликозидфосфотрансфераз у микроорганизмов рода *Streptomyces*. // Проблемы медицинской микологии, 2018 г, Т. 20, № 2, стр. 109.

5. Alekseeva M.G., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Mavletova D.A., Rudakova N.N., Zakharevich N.V., Korzhenevskiy D.A., Ziganshin R.H., Popov V.O., Danilenko V.N. Identification, functional and structural characterization of novel aminoglycoside phosphotransferase APH(3'')-Id from *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. // Arch. Biochem. Biophys., 2019, V. 671, № 4, P. 111-122. doi: 10.1016/j.abb.2019.06.008.

Материалы конференций:

1. Рудакова Н.Н., Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы *Streptomyces rimosus*: структура, функции, вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. // Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XIX Кашкинские чтения). 14-16 июня 2016 г., Санкт-Петербург, Россия, с. 109.

2. Рудакова Н.Н., Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Изучение структуры и функций аминогликозидфосфотрансфераз штамма *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970. // Всероссийская конференция с международным участием "50 лет ВОГиС: успехи и перспективы". 08-10 ноября 2016 г., Москва, Россия, с. 270.

3. Рудакова Н.Н., Алексеева М.Г., Мавлетова Д.А., Ватлин А.А., Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Даниленко В.Н. Аминогликозидфосфотрансферазы актинобактерий: структура и функции, вклад в устойчивость к аминогликозидным антибиотикам у возбудителей туберкулеза и актиномикозов. // III Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» XI съезд Белорусского общества генетиков и селекционеров. 23–25 ноября 2016 г., Минск, Респ. Беларусь, с. 36.

4. Rudakova N.N., Alekseeva M.G., Zakharevich N.V., Mavletova D.A., Elizarov S.M., Shur K.V., Danilenko V.N. The study of distribution and functions of aminoglycoside phosphotransferases from soil microorganisms of the genus *Streptomyces*. // II International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, IC2AR. 12-15 июня 2017, Капарика, Португалия, с. 228-229.

5. Рудакова Н.Н., Алексеева М.Г., Беккер О.Б., Захаревич Н.В., Мавлетова Д.А., Даниленко В.Н. Изучение распространения, структуры и функций аминогликозидфосфотрансфераз у микроорганизмов рода *Streptomyces*. // Всероссийский Конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXI Кашкинские чтения). 6-8 июня 2018 г., Санкт-Петербург, Россия, с. 109.

На автореферат диссертации отзывы прислали:

1. Демаков Виталий Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор по специальности «микробиология», член–корреспондент РАН, директор Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук. Отзыв положительный, без замечаний.

2. Митькин Никита Александрович – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН). Отзыв положительный, без замечаний.

3. Евстропов Александр Николаевич – доктор медицинских наук, профессор по специальности вирусология, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. Отзыв положительный, без замечаний.

4. Горовиц Эдуард Семенович – доктор медицинских наук, профессор по специальности микробиология, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии Пермского государственного медицинского университета имени

академика Е.А. Вагнера, заслуженный деятель науки РФ. Отзыв положительный, без замечаний.

5. Баймиев Алексей Ханифович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук. Отзыв положительный, без замечаний.

6. Шипулин Герман Александрович – кандидат медицинских наук, заместитель генерального директора по научно-производственной деятельности Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения РФ. Отзыв положительный, без замечаний.

7. Кутукова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории № 2 Акционерного общества «Научно – исследовательский институт Аджиномото – Генетика». Отзыв положительный, без замечаний.

8. Мавзютов Айрат Радикович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессор кафедры лабораторной диагностики ИДПО Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заслуженный деятель науки Республики Башкортостан. Отзыв положительный, без замечаний.

9. Припутневич Татьяна Валерьевна – доктор медицинских наук по специальности (микробиология), заведующая отделом микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Отзыв

положительный, есть небольшие замечания, ответы на них представлены в стенограмме заседания.

10. Зинченко Владислав Владимирович – доктор биологических наук, профессор, кафедра генетики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Отзыв положительный. Есть замечания грамматического и стилистического характера. Ответы на замечания представлены в стенограмме заседания.

11. Салахутдинов Нариман Фаридович - доктор химических наук по специальности органическая химия, профессор, заведующий отделом медицинской химии, заведующий лабораторией ФАВ, Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Отзыв положительный. Есть одно незначительное замечание. Ответ приведен в стенограмме заседания.

12. Попова Александра Антоновна – кандидат биологических наук по специальности генетика, старший научный сотрудник лаборатории метаболизма экстремофильных прокариот, Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Отзыв положительный. Есть замечания, которые носят рекомендательный характер и совершенно не снижают значения представленных в автореферате диссертации результатов и общее благоприятное впечатление, производимое работой. Ответы на замечания представлены в стенограмме заседания.

Выбор официальных оппонентов определяется их большим опытом в области генетики микроорганизмов, включая представителей рода *Streptomyces*, а также наличием публикаций в ведущих рецензируемых изданиях по тематике работы.

Выбор ведущей организации обосновывается высоким уровнем проводимых в ней исследований в области фундаментальной и прикладной генетики и геной инженерии микроорганизмов, а также высоким профессиональным уровнем сотрудников.

Диссертационный совет отмечает, что соискателем проведено изучение экспрессии генов и структурно-функциональный анализ аминокликозидтрансфераз штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 с использованием сложного и многокомпонентного комплекса молекулярно-генетических, биоинформатических, биохимических и микробиологических методов. Все использованные в работе методы показали свою эффективность для изучения генов устойчивости к антибиотикам.

В штамме *S. rimosus* ATCC 10970 впервые идентифицирован и биохимически охарактеризован новый ген *aph(3'')-Id*, кодирующий стрептомицин фосфотрансферазу. В рамках изучения свойств белка *Aph(3'')-Id*, впервые для *Aph* была продемонстрирована способность фермента подвергаться автофосфорилированию *in vitro*. Получены трехмерные структуры белка *Aph(3'')-Id S. rimosus* ATCC 10970 в апо-форме и в комплексе со стрептомицином и АДФ с разрешением 1.17 и 1.65 Å соответственно. Данные структуры являются первыми для ферментов подсемейства *Aph(3'')*.

Установлено и изучено влияние генов серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) на повышение устойчивости *E. coli* к аминокликозидам при совместном клонировании гена аминокликозидфосфотрансферазы *aphSR2* и генов СТПК *pkSR1* и *pkSR2*, локализованных в одном кластере генома *S. rimosus subsp. rimosus* ATCC 10970. Установлено, что в совместной конструкции *E. coli/aphSR2/pkSR1* происходит повышение уровня устойчивости к неомицину в 2 раза. *AphSR2* является второй после *Aph(3')-VIII* аминокликозидфосфотрансферазой стрептомицетов, и, в частности, *S. rimosus* ATCC 10970, для которой полученные данные показывают, что уровень устойчивости повышается СТПК.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что в процессе изучения *Aph* данного штамма установлен новый механизм модуляции активности фермента посредством автофосфорилирования.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики: штаммы *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиды с

клонированными *aph* генами, разработанные методы выделения белков и выделенные рекомбинантные белки могут быть использованы в научно-исследовательских работах с последующим потенциальным применением в области практической медицины. Получение пространственных структур аминокликозидфосфотрансфераз нового типа позволит проводить сравнительный анализ их структур с известными структурами Aph(3')-VIII и Aph(3')-IIa и Aph(3')-IIIa из клинических изолятов, а также проводить отбор ингибиторов Aph – потенциальных лекарственных препаратов.

Оценка достоверности результатов исследования: результаты исследования получены с применением современных молекулярно-генетических методов и программ для статистической обработки данных; все методы, использованные в исследовании, подробно описаны в работе; результаты исследования представлены в рецензируемых научных изданиях и материалах российских и международных конференций.

Личный вклад соискателя заключается в выполнении большей части исследований. Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы: в планировании и осуществлении экспериментов, оценке и интерпретации результатов. Биоинформатический и филогенетический анализ *aph*-генов штамма *S. rimosus* ATCC 10970 проводился совместно с кандидатом биологических наук Алексеевой М.Г. и кандидатом биологических наук Захаревич Н.В. Клонирование генов *aph(3'')-Id*, *aphSR2*, *pkSR1*, *pkSR2* и *aacSR*, изучение их экспрессии в *E. coli* и выделение рекомбинантного белка Aph(3'')-Id проводилось совместно с кандидатом биологических наук Алексеевой М.Г. Транскрипционный анализ экспрессии генов резистоста штамма *S. rimosus* ATCC 10970 проводился совместно с Беккер О.Б. Анализ фосфотрансферазной активности белка Aph(3'')-Id *in vitro* и исследование автофосфорилирования рекомбинантного белка Aph(3'')-Id *in vitro* проводились совместно с кандидатом биологических наук Мавлетовой Д.А., кандидатом биологических наук Елизаровым С.М. (Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук» Институт биохимии им. А.Н. Баха) и Скобловым Ю.С. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук). Нарботка биомассы штамма *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET16b:aph(3")-Id в ферментере для последующей кристаллизации белка Aph(3")-Id проводилась совместно с кандидатом биологических наук Алексеевой М.Г. и Князевой Л.М. Автор также являлся основным участником при написании статей по результатам работы.

Диссертация полностью соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 23 сентября 2013 г.

На заседании 19 декабря 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Рудаковой Наталье Николаевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 14 докторов наук по специальности 03.02.07 - генетика, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за – 14 человек, против – нет, недействительных бюллетеней - нет.

Заместитель председателя
диссертационного совета
Ученый секретарь
диссертационного совета



Муха Д.В.

Горячева И.И.

«19» декабря 2019 года

Подпись
удостоверяю



Ученый секретарь
д.б.н.
Абилев С.К.

