

Ивашина Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук (03.00.07 Микробиология)
старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Rusanov, A. L. Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins. / A.L. Rusanov, T.V. Ivashina, L.M. Vinokurov, I.I. Fiks, A.G. Orlova, I.V. Turchin, I.G. Meerovich, V.V. Zherdeva, A.P. Savitsky // *J. Biophotonics*. – 2010. – V. 12. – P. 774–783.
2. Арсланбаева, Л. Р. Генетически кодируемая FRET-пара на основе тербий-связывающего пептида и красного флуоресцентного белка. / Л.Р. Арсланбаева, В.В. Жердева, Т.В. Ивашина, Л.М. Винокуров, А.Л. Русанов, А.П. Савицкий // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2010. – Т. 46. – №2. – С. 1–6.
3. Arslanbaeva, L. R. Induction-resonance energy transfer between the terbium-binding peptide and red fluorescence proteins DsRed2 and TagRFP. / L.R. Arslanbaeva, V.V. Zherdeva, T.V. Ivashina, L.M. Vinokurov, V.B. Morozov, A.N. Olenin, A.P. Savitskii // *Biophysics*. – 2011. – V. 56. – №3. – P. 381–386.
4. Ivashina, T. V. Exopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: from genes to functions. / T.V. Ivashina, V.N. Ksenzenko // Chapter 4. In: “*The Complex World of Polysaccharides*”, D. N. Karunaratne (ed.), InTech. – 2012. – P. 99–126.
5. Ivashina, T. V. Cholesterol oxidase ChoD is not a critical enzyme accounting for oxidation of sterols to 3-keto-4-ene steroids in fast-growing *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D. / T.V. Ivashina, V.M. Nikolayeva, D.V. Dovbnaya, M.V. Donova // *J. Steroid Biochem Mol Biol.* – 2012. – V. 9. – Issue 1-2. – P. 47–53.
6. Bragin, E. Y. Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. strains. / E.Y. Bragin, V.Y. Shtratnikova, D.V. Dovbnaya, M.I. Schelkunov, Y.A. Pekov, S.G. Malakho, O.V. Egorova, T.V. Ivashina, S.L. Sokolov, V.V. Ashapkin, M.V. Donova // *J. Steroid Biochem Mol Biol.* – 2013. – V. 138. – P. 41–53.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина
Российской академии наук

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Винниковой Анны Николаевны “Синтез аналогов бактериального ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров”, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.03 – Органическая химия

Диссертационная работа А.Н. Винниковой посвящена разработке и оптимизации методов синтеза новых аналогов бактериальных ундекапренилфосфатов (УФОС) и ундекапренилдифосфатсахаров (УДФС), содержащих на ω -конце липидной цепи флуоресцентные и хромофорные группы атомов, а также тестированию их биологической активности на модели сборки О-антигенов ряда грамотрицательных бактерий.

Востребованность такого рода соединений совершенно очевидна и определяется следующим. Прежде всего, следует сказать, что ундекапренилфосфат является ключевым природным соединением, участвующим в биосинтезе различных углеводсодержащих биополимеров клетки, в частности гликопротеинов, пептидогликана, липополисахаридов, капсульных полисахаридов и внеклеточных гетерополисахаридов. Важная роль этих полимеров в сложных межклеточных взаимодействиях и сигнальных процессах определяет интерес исследователей к изучению механизмов их биосинтеза, поиску новых антибактериальных препаратов, ингибирующих тот или иной этап в биосинтезе полисахаридов, которые, в свою очередь, являются факторами патогенности многих микроорганизмов и обеспечивают их иммунологические реакции. Более того, участие изопреноидов в посттрансляционной модификации белков (пренилировании) растительного и животного происхождения, представляет интерес для исследования молекулярных механизмов пролиферации клеток и поиску путей ингибирования этого процесса в раковых клетках. Следует также подчеркнуть, что выделение полипренилфосфатов из природных источников затруднено вследствие сложности и трудоемкости процесса, а также низкой их концентрации. К преимуществам использования синтетических

флуоресцирующих аналогов УФОС и УДФС следует отнести: возможность избежать применения дорогостоящих радиоактивных доноров гликозильных остатков для детекции продуктов биохимических реакций с их участием, возможность применения флуоресцентной микроскопии для решения целого спектра фундаментальных задач, а также повышение чувствительности детектирования этих соединений и их производных.

В связи со сказанным выше абсолютно обоснованными представляются цели и задачи предпринятого А.Н. Винниковой исследования – синтез и анализ биологической активности новых флуоресцирующих аналогов ундекапренилфосфатов и ундекапренилдифосфатсахаров.

Диссертация А.Н. Винниковой написана на 98 страницах текста, состоит из разделов: “Введение”, “Обзор литературы”, “Обсуждение результатов”, “Экспериментальная часть”, “Выводы”. Список литературы включает 124 источника. Диссертация иллюстрирована многочисленными схемами и 5 рисунками, которые демонстрируют большой объем аналитической и экспериментальной работы.

Во введении, может быть в излишне сжатой форме, изложены предпосылки и цели исследования, которые по своей значимости безусловно соответствуют уровню исследований кандидатской диссертации, обоснована актуальность работы, а также отмечена ее новизна. В автореферате этот пробел восполнен.

В обзоре литературы (26 страниц текста) А.Н. Винниковой обстоятельно проанализирован доступный на сегодняшний день материал, касающийся подходов и методов синтеза изопреноидов, содержащих флуоресцентные, хромофорные и фотоактивируемые метки. Детально рассмотрено строение изопреноидов, свойства и различные аспекты их применения для изучения функций гликозилтрансфераз, пренилирования белков, изучения субстрат-ферментных комплексов как *in vitro*, так и *in vivo* методами флуоресцентного резонансного переноса энергии, фотореактивного

зондирования. В целом, обзор отражает современное состояние проблемы и свидетельствует о широкой эрудиции автора в данной области исследований.

Результаты собственных исследований автора и их обсуждение представлены на 21 страницах текста.

На первом этапе работы на основе морапренола проведен восьмистадийный синтез изопреноидного аналога бактериального УФОС, содержащего фенокси группу на ω -конце олигоизопреновой цепи. Структуры промежуточных и конечного продукта - феноксиморапренилфосфата подтверждены данными спектров ЯМР, ИК и ESI. Способность полученного соединения служить акцептором гликозильных остатков продемонстрирована в реакции инициирования сборки повторяющихся звеньев O-антигенов, катализируемой ассоциированной с мембранами UDPGlcNAc: полипренилфосфат-GlcNAc-фосфотрансферазой из двух бактерий – *Salmonella arizona* O:59 и *Aeromonas hydrophila* AH-1. Несмотря на двухкратное снижение акцепторной активности у феноксиморапренилфосфата по сравнению с морапренилфосфатом, его использование позволяет выявление продуктов биосинтетических реакций по специфическому поглощению ароматического ядра в УФ-области.

На следующем этапе был проведен синтез серии новых флуоресцентных неизопреноидных аналогов УФОС - 11-[(9'-антраценилкарбонил)амино]ундецилфосфата и 11-[(9'-антраценил)метокси]ундецилфосфата, - строение которых подтверждено данными ЯМР и масс-спектрометрии. В этой же части работы показано, что синтезированные соединения могут выступать в качестве акцепторов галактозилфосфатного остатка UDP-Gal в реакции с участием галактозилфосфотрансферазы Gal-T из *Salmonella newport*.

Логическим продолжением работы стало получение неизопреноидных аналогов ундекапренилдифосфатсахаров, содержащих флуорофорные группы. Важным результатом работы является демонстрация акцепторной активности синтезированных $P^1\{11-[(9'-антраценил)метокси]ундецил\}-P^2-(\alpha-$

D-галактопиринозил)дифосфата и $P^1\{11-[(9'-\text{антраценил)метокси}]ундецил\}$ - P^2 -(2-ацетомидо-2-дезоксид- α -*D*-галактопиринозил)дифосфата в реакциях, катализируемых рядом гликозилтрансфераз биосинтеза липополисахаридов грамотрицательных бактерий с образованием целевых продуктов. Образование последних также подтверждено экспериментально.

Завершает раздел исследование по влиянию размеров липофильной части неизопреноидных аналогов ундекапренилдифосфатгалактозы на их акцепторные свойства. Для реализации этой части работы автором синтезированы четыре новых флуоресцентных аналога ундекапренилдифосфатгалактозы, строение которых подтверждено ЯМР-спектроскопией. Способность полученных соединений служить субстратами-акцепторами гликозильных остатков подтверждена в экспериментах с маннозилтрансферазой *Salmonella newport* при использовании в качестве доноров остатков маннозы как радиоактивной GDF- $[^{14}\text{C}]\text{Man}$, так и немеченной GDF-Man. В результате показано, что наиболее высокой активностью обладает соединение с более протяженным липидным фрагментом.

В экспериментальной части работы в форме, достаточной для их воспроизведения, дается детальное описание использованных автором методов синтеза, очистки бактериальных аналогов УФОС и УДФС и установления их строения с использованием широкого арсенала современных физико-химических методов (^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения), что свидетельствует о высоком уровне экспериментальной работы. В этом же разделе автор описывает методические подходы для тестирования биологической активности полученных соединений, а также структурного анализа продуктов биохимических реакций. Следует подчеркнуть, что выбор методов и подходов представляется оптимальным для реализации поставленных задач и не оставляет сомнения в достоверности полученных результатов.

В рассматриваемой диссертации встречается ряд неточностей. Так, например, упомянутый автором штамм *E. coli* BL21 (стр. 43) не может быть использован для экспрессии *wbdN* и *wbwC*, поскольку не содержит в геноме гена, кодирующего РНК-полимеразу фага T7, которая высоко специфична по отношению к своему промотору, под контролем которого и клонировали соответствующие гены. По-видимому, автор имел в виду штамм *E. coli* BL21(DE3) или его аналоги. Нельзя клонировать ферменты и бактерии (стр. 43, 53). В конце главы 4 раздела «Обсуждение результатов» (стр. 51), на мой взгляд, не хватает заключения. Хотелось бы видеть в тексте диссертации интерпретацию данных по влиянию размеров липофильной части неизопреноидных аналогов ундекапренилдифосфатгалактозы на их акцепторные свойства. Встречаются опечатки. Отмеченные недостатки не снижают ценность полученных результатов и носят рекомендательный характер.

Результаты диссертационной работы опубликованы в виде 3-х статей в престижных зарубежных журналах и 3-х статей в реферируемых отечественных журналах. Материалы работы доложены автором на трех международных и двух всероссийских конференциях. Работа неоднократно поддерживалась грантами РФФИ.

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные, несомненно, являются приоритетными. Синтезированные функционально активные соединения и разработанные методические подходы могут быть успешно использованы в научных учреждениях химического, биологического и медицинского профиля, проводящих работы в области биотехнологии, биохимии ферментативных систем биосинтеза различных классов гликоконъюгатов.

Подводя итог сказанному, следует сделать вывод о том, что диссертационная работа А.Н. Винниковой является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом и теоретическом уровне. Выводы, сделанные в работе, подтверждены

экспериментально. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

На основании изложенного можно заключить, что по актуальности задач проведенного исследования, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа А.Н. Винниковой "Синтез аналогов бактериального ундекапренилфосфата и ундекапренилдифосфатсахаров" соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Винникова Анна Николаевна, несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.03 - Органическая химия.

Ф.И.О. составителя:

Ивашина Татьяна Владимировна

Почтовый адрес:

142290 Пушкино, Московская область, Проспект Науки, д. 5
8(4967)318690

Телефон:

Адрес электронной почты:

ivashina@ibpm.pushchino.ru

Наименование организации:

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Должность:

старший научный сотрудник, к.б.н.

Подпись Т.В. Ивашиной заверяю,
Ученый секретарь ИБФМ
им. Г.К. Скрыбина РАН,
доктор биологических наук,
28 ноября 2014 г.



Т.А. Решетилова