

На правах рукописи

МАСЛОВ Дмитрий Антонович

**СОЗДАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОТБОРА ИНГИБИТОРОВ СЕРИН-
ТРЕОНИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ МИКОБАКТЕРИЙ**

Специальность 03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор

ДАНИЛЕНКО Валерий Николаевич, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, доцент

ЕЛАНСКАЯ Ирина Владимировна, ведущий научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Доктор биологических наук, профессор

ИЛЬИНА Елена Николаевна, заместитель генерального директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва.

Ведущая организация:

Государственный научный центр Российской Федерации ФГУП Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов («ГосНИИгенетика»), г. Москва.

Защита состоится «1» декабря 2016 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института www.vigg.ru, тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Туберкулез является одним из самых социально-значимых заболеваний современности, уносящим более миллиона человеческих жизней ежегодно. Одной из причин трудности лечения туберкулеза в настоящее время является массовое возникновение множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивости у возбудителя туберкулеза, что вызвано длительным использованием одного и того же набора противотуберкулезных препаратов в течение последних десятилетий. Улучшение результатов лечения туберкулеза зависит от развития современной фармацевтики, главным направлением которого является разработка технологических подходов к созданию новых лекарственных средств путем воздействия на новые биомишени, важные для жизнедеятельности возбудителя туберкулеза - *Mycobacterium tuberculosis*. Важнейшими среди таких мишеней являются протеинкиназы – белки, осуществляющие передачу внутриклеточных сигналов. Серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) – одни из наиболее универсальных регуляторов жизнеспособности про- и эукариотических клеток. Эти ферменты у микобактерий, в частности, регулируют такие важные процессы жизнедеятельности клетки, как рост и деление, вирулентность, персистенция и природная лекарственная устойчивость к антибиотикам.

Разработанность темы исследования. Концепция разработки антибактериальных препаратов (в том числе противотуберкулезных), применяемая в течение последних 15 лет, основанная на биохимическом мишень-направленном отборе соединений, оказалась относительно ограниченной, применительно к *M. tuberculosis*, в связи с тем, что подавляющее большинство отобранных таким способом соединений не оказывало действие на бактериальную клетку в силу разных причин, одной из которых является непроницаемость бактериальной клеточной стенки. В последнее время наметилась тенденция к возвращению на новом уровне знаний и техники к высокопроизводительному отбору на бактериальных культурах *M. tuberculosis* H37Rv, а также родственных ему модельных штаммах *M. bovis* BCG и *M. smegmatis*. При этом исследуются библиотеки из числа химических соединений, достигающего нескольких миллионов, однако позже возникает необходимость установления внутриклеточной биомишени, на которую действует отобранное вещество.

Ранее разработана тест-система на основе штамма *Streptomyces lividans* TK24(66) для мишень-направленного прескрининга ингибиторов СТПК. Ключевым элементом разработанной тест-системы является фермент аминогликозид-3'-фосфотрансфераза типа VIII (AphVIII) штамма *Streptomyces rimosus* ATCC 10970, обеспечивающий устойчивость актинобактерий к аминогликозидным антибиотикам. Важной особенностью белка APHVIII *S. rimosus* ATCC 10970 является зависимость активности фермента от уровня его фосфорилирования СТПК, при этом фосфорилированная форма APHVIII в 6-7 раз активнее нефосфорилированной.

Цель работы. Создать тест-систему на основе штамма *M. smegmatis*, экспрессирующего ген *aphVIII*, для мишень-направленного отбора ингибиторов микобактериальных СТПК, в том числе СТПК *M. tuberculosis* – потенциальных противотуберкулезных препаратов нового поколения и провести отбор активных ингибиторов СТПК среди соединений новых химических классов.

Задачи:

1. Исследовать возможность использования быстрорастущей непатогенной бактерии *M. smegmatis* в качестве модели для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*;
2. Сконструировать тест-систему *M. smegmatis aphVIII+* и валидировать ее со стандартными ингибиторами СТПК;
3. Установить основные СТПК, способные фосфорилировать белок APHVIII в микобактериях, являющиеся мишенями отбираемых ингибиторов, исследовать возможность мутагенеза *aphVIII* с целью повышения узнаваемости жизненно-важными СТПК микобактерий;
4. Провести *in vitro* исследования киназной активности СТПК-мишеней и изучить ингибирование этой активности стандартными ингибиторами СТПК;
5. Провести в сконструированной тест-системе отбор ингибиторов СТПК среди низкомолекулярных соединений различных химических классов.

Научная новизна. Впервые исследована возможность использования *M. smegmatis*, в качестве модельного объекта для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*. Впервые проведена экспрессия гена *aphVIII* *S. rimosus* в клетках *M. smegmatis*, исследовано, какие СТПК *M. smegmatis* принимают участие в фосфорилировании этого белка, и следовательно являются потенциальными мишенями для отбора ингибиторов. Впервые исследовано *in vitro* действие ингибиторов СТПК различных химических классов на активность белка APHVIII.

Практическая значимость. Созданная и валидированная тест-система *M. smegmatis aphVIII+* совмещает в себе плюсы отбора потенциальных противотуберкулезных препаратов на клеточном уровне с мишень-направленным скринингом *in vitro*. На примере проведенного отбора среди низкомолекулярных соединений классов триазолотетразинов, аминопиридинов и аминопиримидинов, проявивших антимикобактериальную активность как на клеточном уровне, так и *in vitro*, а также проведенных доклинических испытаний одного из отобранных соединений – TSV-395, было показано, что созданная тест-система может быть использована для поиска новых противотуберкулезных препаратов, соответствующих современным предъявляемым требованиям, в том числе преодолевающих проблему МЛУ штаммов *M. tuberculosis*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Быстрорастущая бактерия *M. smegmatis*, содержащая в своем геноме гены, кодирующие гомологи СТПК *M. tuberculosis*, является подходящей моделью для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*;
2. Тест-система *M. smegmatis aphVIII+* способна отбирать активные ингибиторы микобактериальных СТПК, в частности жизненно-важной PknA
3. Отбираемые в тест-системе вещества ингибируют непосредственно СТПК, а не белок APHVIII;
4. Отобранные в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+* соединения являются потенциальными противотуберкулезными средствами нового поколения.

Степень достоверности и апробация результатов. Автором опубликовано 3 статьи по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также 3 патента. Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: на 38м конгрессе Федерации Европейских Биохимических Сообществ (38th FEBS Congress, Санкт-Петербург, июль 2013 г.), на II конгрессе национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, ноябрь 2013 г.) и на Саммите по туберкулезу 2015 (The 2015 TB Summit, Лондон, март 2015 г.). Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2011-2013 гг. Апробация диссертационной работы была проведена 26 мая 2016 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН.

Личный вклад автора в исследование. Автором лично выполнена подавляющая часть работы, а именно: выделение ДНК, конструирование праймеров, проведение ПЦР, электрофореза в агарозном геле и электрофореза белков в ПААГ в денатурирующих условиях, подготовка проб на секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей, мутагенез гена *aphVIII* и его клонирование в составе экспрессионных векторов, вся микробиологическая работа с непатогенными *E. coli* и *M. smegmatis*. Эксперименты по исследованию *in vitro* киназной активности и цитотоксичности проводились при личном участии автора совместно с сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН.

Молекулярный докинг проводился в лаборатории медицинской химии Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова совместно с н.с., к.х.н. Д.И. Осолодкиным.

Работы с патогенной бактерией *M. tuberculosis* были проведены в отделе микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза под руководством проф. д.б.н. Л.Н. Черноусовой.

Автор лично проводил анализ полученных результатов и оформлял результаты для представления в виде тезисов и докладов на научных конференциях, а также принимал участие в написании статей и патентов по результатам работы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, четырех глав обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений, списка цитируемой литературы и благодарностей. Работа изложена на 148 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц и 32 рисунка. Список используемой литературы включает 226 публикаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Первые четыре главы диссертации посвящены литературному обзору, описывающему: проблему и механизмы лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к существующим лекарственным препаратам; подходы к разработке новых противотуберкулезных препаратов; общую характеристику бактериальных СТПК эукариотического типа и СТПК *M. tuberculosis* в частности как привлекательных биомишеней; существующие тест-системы на основе гена *aphVIII S. rimosus* для отбора ингибиторов СТПК эукариотического типа.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования. В работе использовались штаммы *Escherichia coli* (DH5a, JM110, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS) и штамм *M. smegmatis* mc² 155.

Для культивирования штаммов *E. coli* использовали среду LB (Amresco, США), а для *M. smegmatis* – среду Lemco-Tw (5 г/л Lemco Powder, 5 г/л NaCl, 5 г/л бактопептона, 0,05% Tween-80). Культивирование бактерий в жидкой среде проводили при 37⁰С и 250 об/мин. Твердые среды содержали 2,0% агара. В качестве среды для тестирования соединений в тест-системе использовали среду M290 (триптон-соевый агар, HiMedia, Индия).

Плазмидные векторы. В экспериментах по клонированию фрагментов ДНК и гетерологической экспрессии генов в клетках *M. smegmatis* использовали челночные векторы pMIND и pSMT3-mCherry. Для гетерологической экспрессии генов серинтреониновых протеинкиназ в клетках *E. coli* использовали вектор pET-32a (Novagen).

Олигонуклеотиды. Синтез олигонуклеотидов проводили в фирме «Синтол». Олигонуклеотиды для клонирования подбирали вручную при помощи программы Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc.), в то время как для секвенирования клонированных фрагментов в плазмиде – при помощи программы Primer BLAST NCBI.

Манипуляции с ДНК. Выделение плазмиды проводили наборами GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) из культуры *E. coli* объемом до 10 мл, либо набором QIAGEN Plasmid Midi

Kit Plus (QIAGEN) из культуры объемом до 50 мл. Выделение фрагмента ДНК из 1% агарозного геля проводили с помощью наборов GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Очистку ДНК из реакционной смеси (после амплификации, рестрикции либо лигирования) проводили наборами GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFisher Scientific) либо QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

Амплификацию ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием набора High Fidelity PCR Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) на приборах CFX96 (Bio-Rad), SpeedCycler2 (AnalyticJena) и Терцик ТП4-ПЦР01 (ДНК-технология).

Рестрикцию целевых образцов ДНК проводили с использованием эндонуклеаз серии FastDigest фирмы “Fermentas”. При проведении реакции лигирования использовали T4 ДНК лигазу фирмы “Fermentas”. Молярное соотношение вектора и вставки в реакционной смеси составляло 1:5.

Для анализа длины и количества фрагментов ДНК проводили электрофорез в 1% агарозном геле (агароза “Amresco”, США) в электродном буфере TAE (Tris-ацетат 40 mM, EDTA 1 mM, pH=7,6). в качестве маркера длин фрагментов использовали ДНК фага λ , рестрицированного по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *HindIII* (ThermoFischer Scientific, США), либо маркеры серии GeneRuler (ThermoFischer Scientific, США). Точное количество ДНК в пробе устанавливали с использованием набора Qubit dsDNA BR Kit (ThermoFischer Scientific, США) на приборе Qubit (ThermoFischer Scientific, США).

Для проведения сайт-направленного мутагенеза использовали метод точковых мутаций Нельсона.

Трансформация бактериальных клеток. Компетентные клетки *E. coli* получали кальциевым методом (0,1 М раствор CaCl_2), в то время как для клеток *M. smegmatis* применялся метод электропорации в 10% растворе глицерина.

Получение общего белкового лизата бактериальных клеток. Индукцию экспрессии клонированного гена в клетках *E. coli* проводили 1 mM ИПТГ, в то время как для *M. smegmatis* использовали тетрациклин в концентрации 20 нг/мл. Клетки *E. coli* лизировали буфером с SDS, в то время как для *M. smegmatis* применяли обработку ультразвуком.

Электрофорез белков проводили в 12% ПААГ в денатурирующих условиях.

Очистка белков PknA *M. tuberculosis* и AphVIII. Синтез гена *pknA* *M. tuberculosis* с адаптацией кодонов для оптимизации экспрессии в клетках *E. coli* был проведен компанией «Евроген». Ген был синтезирован и клонирован в составе экспрессионного вектора рЕТ-32а. Плазмиды, содержащие гены *pknA* и *aphVIII* были трансформированы в штамм *E. coli* BL21 (DE3) рLysS, экспрессию проводили, как

описано выше. Очистку белков проводили при помощи набора Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, США).

Постановка *in vitro* киназной реакции. Ингибирующая активность соединений в отношении PknA и AphVIII проверялась в киназной реакции при помощи набора Kinase-Glo Plus Luminescent Kinase Assay Kit (Promega, США) на рабочей станции Biomek 3000 (Beckman Coulter, США). Фосфорилирование субстрата оценивали косвенно, по уровню люминисценции остаточной АТФ. В качестве субстрата PknA использовали олигопептид IVDAELTGEIPII, в качестве субстрата AphVIII – канамицин.

Методика тестирования соединений в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*. Культуру *M. smegmatis aphVIII+* разводили в соотношении 1:9:10 (культура:вода:среда M290) и заливали верхним слоем на чашки Петри с агаризованной средой M290 в качестве нижнего слоя. После высыхания чашек с культурой, на них производилось наложение бумажных дисков с исследуемым веществом, либо с канамицином, либо с их комбинацией. Чашки инкубировали при 37°C до появления газона, после чего производили измерение зон ингибирования роста культуры.

Исследование бактериостатического и бактерицидного действия TSV-395 на штаммы *M. tuberculosis*. Бактериостатическое действие соединения TSV-395 в отношении штаммов *M. tuberculosis* изучали по динамике роста культуры в обогащенной жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе BACTEC MGIT 960 в присутствии тестируемого соединения в различных концентрациях. Минимальная бактерицидная концентрация определялась как та, под воздействием которой в условиях *in vitro* число микобактерий в среде снижалось на 99,9% (на 3 порядка)

Исследование антимикобактериальной активности и токсичности TSV-395 в системе *ex vivo* инфицированных перитонеальных макрофагов мыши. Противотуберкулезную активность соединения TSV-395 в модели *ex vivo* определяли по выявлению ДНК микобактерий методом количественной ПЦР в режиме реального времени и по росту микобактерий, фагоцитированных макрофагами, после воздействия соединения TSV-395 при пересеве на агаризованную среду Дюбо. Оценку действия соединения TSV-395 на интактные и зараженные микобактериями макрофаги проводили по выходу из разрушенных макрофагов в среду ЛДГ.

Анализ цитотоксичности аминопиридинов и аминопиримидинов проводили при помощи МТТ-теста на фибробластах эмбриона человека (кожно-мышечная ткань). О жизнеспособности клеток судили по цветной реакции, развивающейся при восстановлении тетразоля в формазан дегидрогеназами митохондрий. Окраску регистрировали на ридере Beckman Coulter DTX 880 (Multimode Detector) при длине

волны возбуждения 595 нм. Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировались только со средой (контроль), принимали за 100%.

Биоинформатические методы. Последовательности генов были получены из базы данных GenBank NCBI. Аннотацию доменной структуры белков проводили при помощи алгоритма SMART. Гомологию аминокислотной последовательности белков исследовали в программе BLAST. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе Clustal-Omega. Для построения филогенетических деревьев использовали программу MEGA версии 6.06, деревья строили по методу «neighbour-joining». Анализ адаптированности кодонов проводили в программе Graphical Codon Usage Analyser (GCUA) с использованием базы данных использования кодонов.

Молекулярный докинг соединения TSV-395 и АТФ-связывающего кармана PknA *M. tuberculosis* проводили с использованием методологии Surflex, реализованной в программном пакете SYBYL-X 1.3.

Результаты и обсуждение

Исследование возможности использования *M. smegmatis* как модели для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*. *M. smegmatis* это быстрорастущие сапрофитные микобактерии, работа с которыми облегчается отсутствием патогенности, а также сравнительно нетрудоёмкими методами генетических манипуляций. Несмотря на то, что клеточная стенка *M. smegmatis* по проницаемости схожа с таковой у *M. tuberculosis*, до 50% препаратов, показывающих антибактериальную активность на *M. tuberculosis* были неактивны по отношению к *M. smegmatis*, что может быть связано, как с различиями в биомишенях, так и с наличием у *M. smegmatis* большого набора клеточных транспортеров, придающих ей природную устойчивость к ряду препаратов.

В связи с этим, на первом этапе работы была поставлена задача исследовать возможность использования *M. smegmatis mc² 155*, в качестве модели для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*.

Геном *M. smegmatis* содержит 13 генов полноразмерных СТПК. 9 белков из 13 являются рецепторными киназами, имеющими трансмембранный домен, и 4 являются растворимыми цитозольными СТПК.

Проведено сравнение аминокислотных последовательностей как киназных доменов, так и полноразмерных СТПК *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* в программах BLAST и Clustal-Omega. На основе множественного выравнивания этих последовательностей, были построены филогенетические деревья, представленные на рисунке 1.

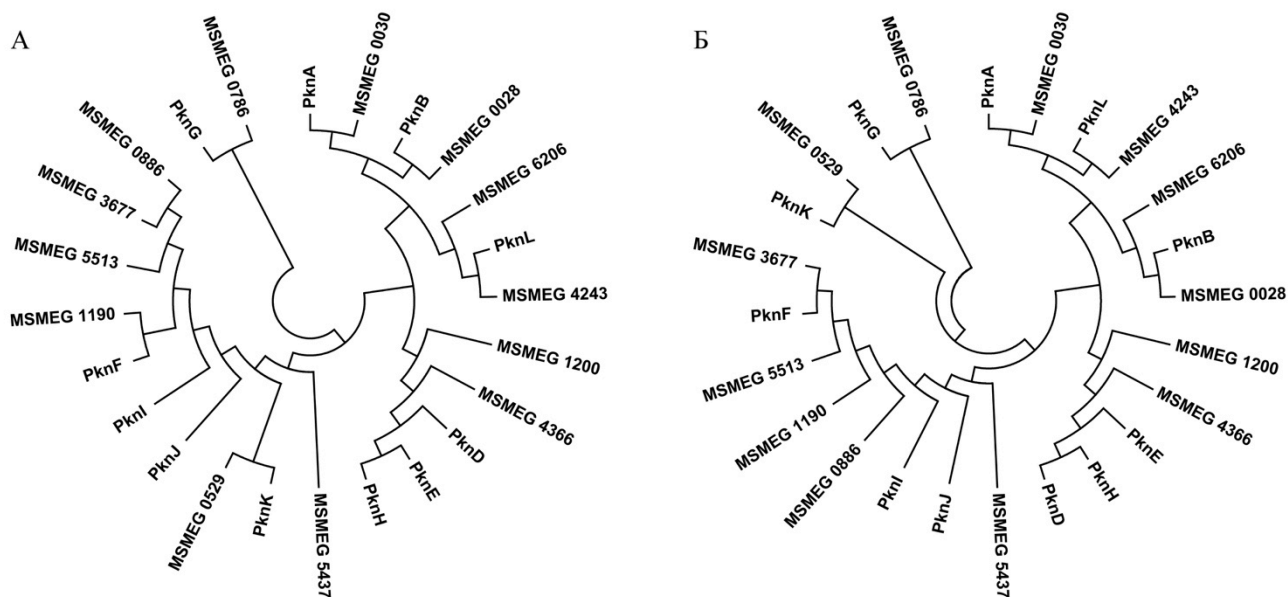


Рисунок 1. Филогенетические деревья, построенные на основе выравнивания аминокислотных последовательностей (А) каталитических доменов и (Б) полноразмерных СТПК *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*.

Как видно из рисунка 1, основные пары гомологов совпадают как по последовательностям киназных доменов, так и по полной аминокислотной последовательности СТПК: PknA-MSMEG_0030, PknB-MSMEG_0028, PknG-MSMEG_0786, PknK-MSMEG_0529 и PknL-MSMEG_4243. Что касается белка PknF, то по киназному домену ему наиболее гомологичен оказался MSMEG_1190, а по всей последовательности белка – MSMEG_3677, а также в обоих вариантах достаточно гомологичны были MSMEG_0886 и MSMEG_5513, что может свидетельствовать о мультипликации гена *pknF* в геноме *M. smegmatis*.

Можно выделить уникальные СТПК для *M. tuberculosis*, среди которых находятся ключевые для вирулентности PknD, PknE, а также протеинкиназы PknH, PknI и PknJ. Для *M. smegmatis* уникальными можно считать протеинкиназы MSMEG_5437, MSMEG_1200, MSMEG_4366 и MSMEG_6206.

На основе проведенного анализа можно сделать вывод, что *M. smegmatis* является подходящей моделью для отбора ингибиторов следующих СТПК *M. tuberculosis*: жизненно-важных PknA, PknB и PknG, а также PknF, PknK и PknL.

Конструирование тест-системы *M. smegmatis aphVIII+*. Концепция тест-системы предполагает экспрессию гена *aphVIII S. rimosus* в клетках *M. smegmatis*. Активность белка AphVIII, фосфорилируемого СТПК, повышается, что приводит к повышению уровня устойчивости клеток к канамицину. При добавлении в тест-систему активного ингибитора СТПК, это фосфорилирование снимается и уровень устойчивости падает, что и фиксируется при исследовании. В данной работе был выбран путь гетерологической экспрессии гена *aphVIII* в составе плазмидного вектора.

В нашем распоряжении было два челночных вектора: pMIND, любезно предоставленная проф. А.С. Капрельянцем, и pSMT3-mCherry, любезно предоставленная лабораторией клеточной микробиологии, ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России. Плазмида pMIND, имеющая собственный ген устойчивости к канамицину, требовала модификации для дальнейшей работы. Этот ген был делегирован по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Tth1111* и *BstBI*, с получением плазмиды pMINDKm⁻ (рис. 2).

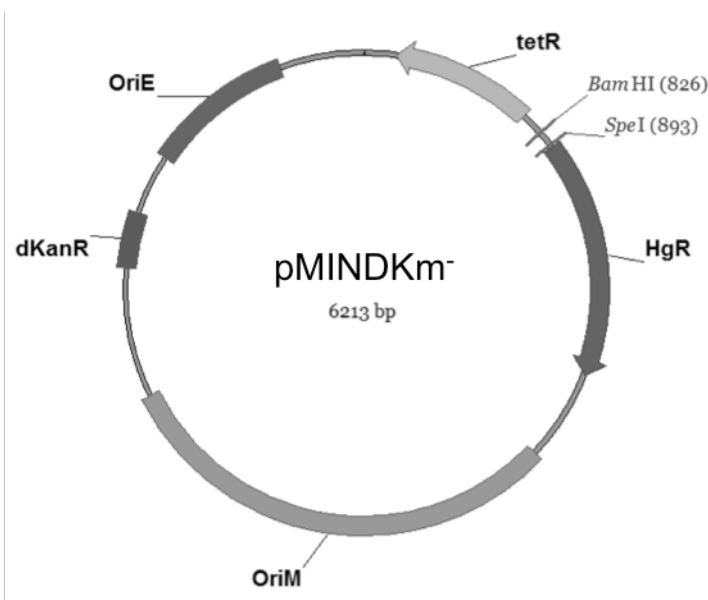


Рисунок 2. Схема вектора pMINDKm⁻. dKanR – фрагмент, оставшийся после делегирования гена аминокликозид 3'-фосфотрансферазы из *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1.

Ген *aphVIII* был клонирован в плазмиду pMINDKm⁻ (по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Spe*I) и pSMT3-mCherry (по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Hind*III), что привело к получению конструкций pMKA8 и pSMT3-aphVIII, соответственно.

Трансформанты *M. smegmatis*, несущие pMKA8 либо pSMT3-aphVIII, приобретали устойчивость к канамицину, по сравнению с контрольными трансформантами, содержащими плазмиды pMINDKm⁻ либо pSMT3-mCherry: в первом случае уровень устойчивости к канамицину достигал 200 мкг/мл агаризованной среды, при индукции 20 нг/мл тетрациклина, во втором – 450 мкг/мл агаризованной среды (индукция не требовалась).

Каждый из используемых в работе экспрессионных векторов имел свои преимущества и недостатки. Так, плазмида pMIND, и ее производная pMINDKm⁻, являлась генетически стабильной, хотя уровень экспрессии клонированного в ней гена был ниже, чем в pSMT3, что показано на уровне устойчивости клеток к канамицину. Вектор pSMT3, в свою очередь, несмотря на более высокий уровень экспрессии клонированного гена, обусловленный сильным конститутивным промотором *hsp60*, имел склонность к генетической нестабильности.

Основным критерием выбора вектора для использования в тест-системе стала стабильность и воспроизводимость получаемых результатов. Для ее оценки был проведен анализ стандартных отклонений результатов измерений зон ингибирования роста вокруг бумажных дисков, содержащих канамицин в различных количествах. Самый стабильный результат *M. smegmatis* pSMT3-aphVIII показал при 300 мкг/диск канамицина (диаметр зоны ингибирования роста $8,9 \pm 1,24$ мм, стандартное отклонение 13,9%). В то же время, для плазмиды pMKA8 была произведена серия измерений с разной концентрацией индуктора тетрациклина (рис. 3).

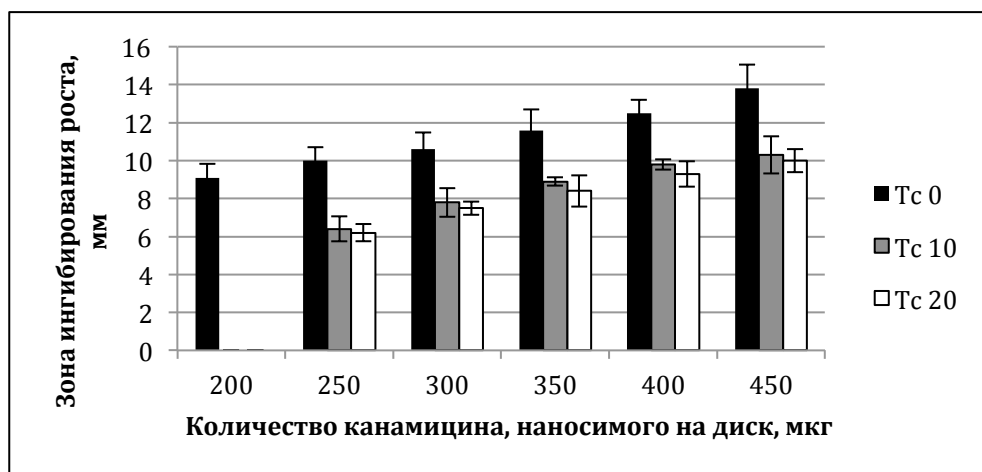


Рисунок 3. Гистограмма результатов измерений диаметров зон ингибирования роста культуры *M. smegmatis* pMKA8 в среде с разным содержанием индуктора тетрациклина (0, 10 и 20 нг/мл), вокруг дисков с разным количеством канамицина (200-450 мкг/диск).

Наименьшее стандартное отклонение наблюдалось при концентрации тетрациклина 10 нг/мл и количестве канамицина 350 мкг/диск (зона $8,9 \pm 0,22$ мм, стандартное отклонение – 2,51%), что и было взято за базовые условия для дальнейшей работы.

Для валидации тест-системы использовали ингибиторы СТПК, различающиеся по степени селективности: BisI (bisindolylmaleimide-I) (Sigma), способный ингибировать широкий спектр СТПК, его неактивный гомолог BisV, отобранный ранее ингибитор СТПК LCTA-1389 (11b), обладающий сравнительной селективностью в отношении Pk25 *S. lividans* и сравнительно селективный ингибитор PknB *M. tuberculosis* – митоксантрон, способный также ингибировать СТПК человека PКС и PIM-1. Вещества вносили в субингибирующих концентрациях.

Добавление ингибиторов BisI и LCTA-1389 приводило к достоверному увеличению зоны подавления роста вокруг диска с канамицином, в то время, как BisV и митоксантрон такого эффекта не проявляли (Рисунок 4, таблица 1). Активность BisI и LCTA-1389 и ее отсутствие у BisV свидетельствуют о том, что сконструированная система избирательно отбирает именно активные ингибиторы протеинкиназ. Отсутствие активности митоксантрона в тест-системе свидетельствует о том, что

ингибиторы киназы MSMEG_0028 (PknB *M. tuberculosis*) в тест-системе не отбираются, что также свидетельствует о селективности тест-системы.

Таблица 1. Зависимость уровня устойчивости к канамицину культуры *M. smegmatis aphVIII+* от действия стандартных ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ.

Обозначение	Мол. формула	Мол. масса	Кол-во, нмоль/диск	Диаметр зоны ингибирования роста, мм (Km + исследуемое вещество)
BisI	$C_{25}H_{24}N_4O_2$	412,48	1000	12,25±0,35
BisV	$C_{21}H_{15}N_3O_2$	341,36	2	9,25±0,35
LCTA-1389 (11b)	$C_{23}H_{19}N_5SO_2$	429	400	11,5±0,75
Mitoxantrone	$C_{22}H_{28}N_4O_6$	444,48	1	9,0±0,50

Диаметр зоны ингибирования роста вокруг диска с канамицином (350 мкг) - 9,4±0,42 мм.

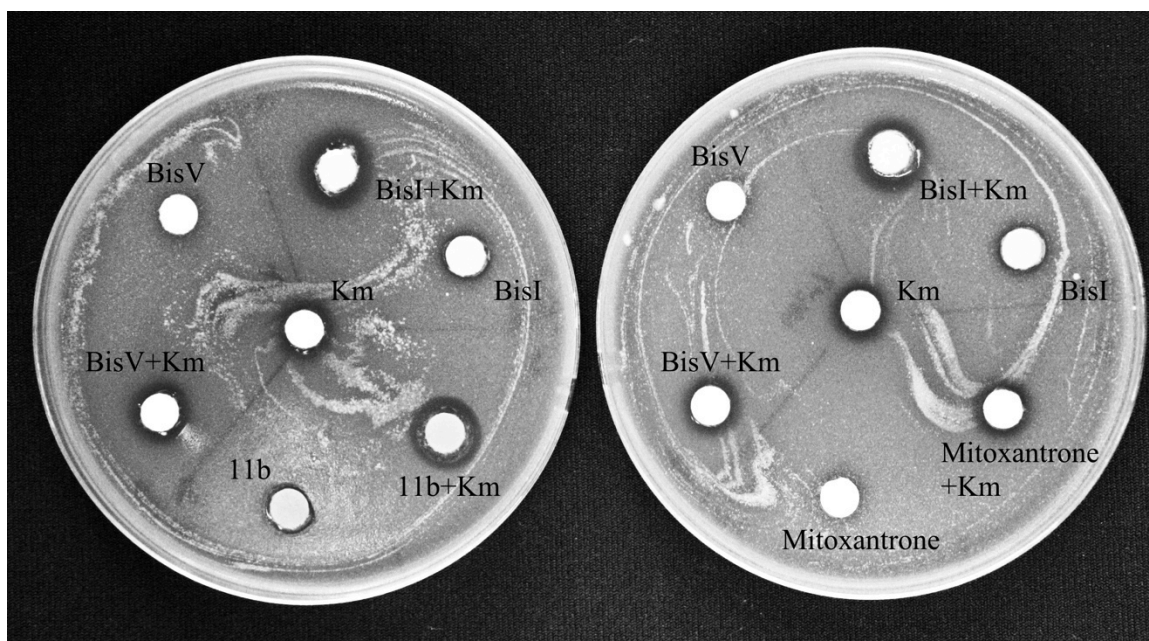


Рисунок 4. Валидация тест-системы *M. smegmatis aphVIII+* со стандартными ингибиторами. Вокруг диска, содержащего канамицин в комбинации с BisI наблюдается увеличенная зона ингибирования роста относительно диска с канамицином, в то время как, вокруг диска с комбинацией канамицина и BisV это явление не наблюдается.

Для исключения предположения, что тестируемые ингибиторы действуют напрямую на APN^{VIII}, была поставлена *in vitro* киназная реакция с белком APN^{VIII} и канамицином в качестве субстрата, которая показала, что они не проявляют ингибирующей активности в отношении APN^{VIII}.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что сконструированная тест-система *M. smegmatis aphVIII*+ функционирует именно за счет ингибирования активности СТПК *M. smegmatis*, способных фосфорилировать AphVIII, а не за счет ингибирования APHVIII, и может быть использована для селективного отбора ингибиторов микобактериальных протеинкиназ.

Фосфорилирование AphVIII, увеличивающее активность этого фермента, происходит по сайту S-146, а мутагенез этого сайта, с целью повышения его сродства с сайтами автофосфорилирования СТПК, может приводить к повышению уровня фосфорилирования APHVIII данными СТПК.

PknB, как одна из двух (вместе с PknA) жизненно важных СТПК *M. tuberculosis*, имеющих близкого гомолога в *M. smegmatis*, представляет огромный интерес при разработке потенциальных противотуберкулезных препаратов на основе ингибиторов микобактериальных СТПК. В связи с этим, была предпринята попытка сайт-направленного мутагенеза APHVIII по S-146, однако за шаблон, помимо варианта, основанного на аминокислотной последовательности сайта автофосфорилирования PknB, была взята оптимальная последовательность узнавания PknB субстрата – RAVGSGTVDLEDL.

Мутантные сайты фосфорилирования APHVIII, а также шаблоны, по которым они были построены, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Сайты фосфорилирования APHVIII (дикого типа и мутантные), а также шаблоны построения мутантных сайтов. Приведены уровни устойчивости *E. coli* BL21 (DE3) содержащей плазмиду pET-32a, и pMINDKm- несущие гены *aphVIII*, к антибиотику канамицину на агаризованой среде LB.

№	Варианты APHVIII с модификацией S ₁₄₆	Устойчивость к Km, мкг/мл	Наименование
1	RAVAEG S ₁₄₆ VDLEDL	75±10	Исходный вариант
2	DFGIARAIADSGNSVTQTAAVIGTA	-	Сайт автофосфорилирования PknB
3	RAVGSG T ₁₄₆ VDLEDL	75±10	AphB3
4	ITVAELTGVIPII	-	Оптимальный сайт узнавания PknB
5	RDVAEGT ₁₄₆ GVLPII	2,5±1,0	AphBD1
6	RDVAEGT ₁₄₆ GELPII	2,5±1,0	AphBD2
7	RLVAEGT ₁₄₆ VDLPII	2,5±1,0	AphBD4
8	RLVAELT ₁₄₆ GDLPII	2,5±1,0	AphBD5
9	ILVAEGT ₁₄₆ VDLPII	2,5±1,0	AphBD6
10	ILVAELT ₁₄₆ GDLPII	2,5±1,0	AphBD7

У мутантов APHVIII, сконструированных по шаблону оптимального сайта фосфорилирования PknB, изменения вызывали драматическое падение уровня устойчивости к канамицину в 30 раз, а индукция экспрессии PknB приводила к ингибированию роста клеток *E. coli*, а не восстановлению уровня устойчивости к канамицину. Таким образом, было показано, что данные модификации аминокислотной последовательности сайта фосфорилирования APHVIII приводят к нарушениям в функционировании белка.

Идентификация СТПК, участвующих в функционировании тест-системы *M. smegmatis aphVIII+*. Известно, что у бактерий, в том числе *M. tuberculosis*, один белок-субстрат может быть фосфорилирован различными СТПК. С целью идентификации СТПК, участвующих в фосфорилировании AphVIII был проведен сравнительный анализ сайтов субстрат-связывания СТПК *M. smegmatis*, а также СТПК Pk25 *S. lividans*, которая, как было показано ранее, участвует в фосфорилировании APHVIII в тест-системе *S. lividans aphVIII+*. На основе выравнивания аминокислотных последовательностей сайтов субстрат-связывания СТПК *M. smegmatis* и Pk25 *S. Lividans* (последовательность сайта – GSADKSVGSPE) было построено филогенетическое древо, представленное на рисунке 5. Согласно этому древу, самой схожей последовательностью сайта субстрат-связывания с Pk25 *S. lividans* обладает СТПК MSMEG_5437 (последовательность сайта – GSADKMVGSLP). Однако, проведенный анализ последовательностей субстрат-связывающего сайта, основанный на физико-химических свойствах составляющих его аминокислот, позволил предположить, что ближайшей по этим свойствам к Pk25 является СТПК MSMEG_5513 (последовательность сайта – GDADKAIGSMS).

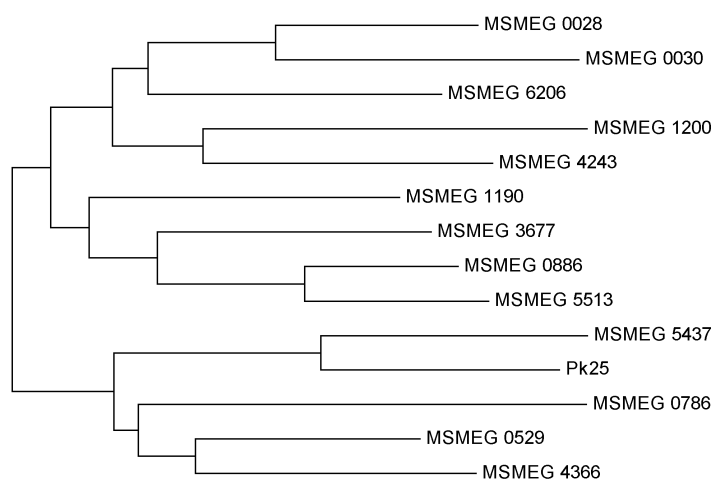


Рисунок 5. Филогенетическое древо, построенное на основе выравнивания аминокислотных последовательностей сайтов субстрат-связывания СТПК *M. smegmatis* и Pk25 *S. lividans*.

Протеинкиназа MSMEG_5437, упоминавшаяся выше, участвует в системе природной лекарственной устойчивости *M. smegmatis*, регулируя, среди прочих, устойчивость к хлорамфениколу и изониазиду. Однако тестирование методом бумажных дисков не выявило увеличения зоны ингибирования роста микобактерий вокруг дисков, содержащих хлорамфеникол или изониазид с ингибитором протеинкиназ (использован тот же набор ингибиторов, что и при валидации тест-системы) при сравнении с зонами вокруг дисков, содержащих только антибиотик. Таким образом, было показано, что данные ингибиторы не действуют на СТПК MSMEG_5437, а следовательно, она не участвует в фосфорилировании APHVIII и функционировании тест-системы.

Единственным наиболее вероятным кандидатом на фосфорилирование APHVIII осталась СТПК MSMEG_5513. В ее пользу также говорит тот факт, что она, согласно классификации СТПК по сигнатурам АТФ-связывающих карманов (по Zakharevich *et al.*, 2012), относится к той же группе (группа I), что и Pk25 *S. lividans*, а следовательно, ингибиторы, действующие на Pk25, должны быть активными и по отношению к MSMEG_5513. Более того, к той же группе относятся СТПК MSMEG_0030 (PknA) *M. smegmatis*, а также PknA и PknJ *M. tuberculosis*.

По итогам проведенного анализа схема функционирования тест-системы *M. smegmatis aphVIII+* представляется следующим образом: MSMEG_5513 фосфорилирует APHVIII в клетках *M. smegmatis*, что повышает уровень устойчивости этих клеток к канамицину. При добавлении активного ингибитора СТПК, действующего на MSMEG_5513, фосфорилирование APHVIII прекращается, что снижает уровень устойчивости клеток к канамицину, при этом собственная токсичность ингибитора для клеток обусловлена ингибированием им же СТПК MSMEG_0030 (PknA), являющейся жизненно важной для микобактерий, а также, возможно, других биомишеней. Ингибиторы СТПК, отбираемые в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*, способны ингибировать PknA и, вероятно, PknJ *M. tuberculosis*. Наглядная схема действия тест-системы представлена на рисунке 6.

Первичный отбор ингибиторов микобактериальных СТПК в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*. тест-система *M. smegmatis aphVIII+* была использована для первичного отбора потенциальных противотуберкулезных препаратов нового поколения – ингибиторов микобактериальных СТПК из двух классов низкомолекулярных соединений: азолотетразинов (54 вещества, предоставленные ИОС УрО РАН), аминопиридинов и аминопиримидинов (192 вещества, предоставленные ООО «Новые Научные Технологии»). Основными критериями отбора «хит»-соединений была антимикобактериальная активность на *M. smegmatis*, а также наблюдаемый эффект в сконструированной тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*.

После подбора субингибирующих концентраций, из 54 веществ класса азоло[1,2,4,5]тетразинов осталось четыре кандидата, обладающих максимальной антимикобактериальной активностью: TSVa130 (субингибирующая концентрация –

25 нмоль/диск), TSV-395 (50 нмоль/диск), TSV-402 (5 нмоль/диск) и TSV-409 (50 нмоль/диск). Все они проявили активность в созданной тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII*⁺ (таблица 3).

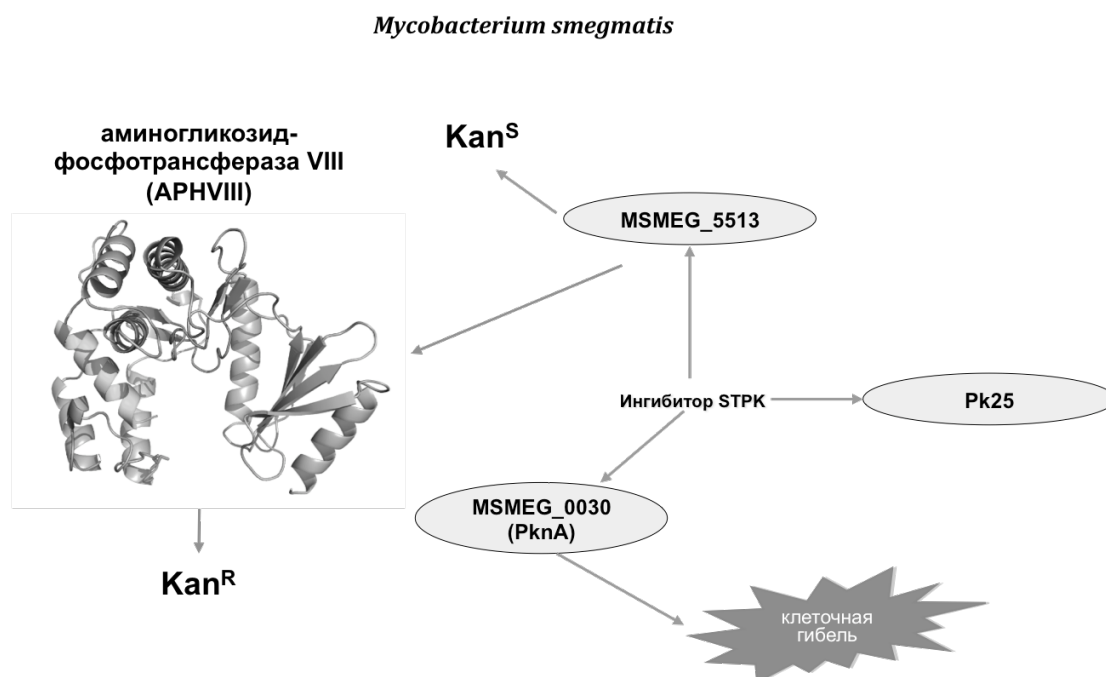


Рисунок 6. Схема действия тест-системы *M. smegmatis* *aphVIII*⁺. Kan^R – повышение устойчивости к канамицину, Kan^S – понижение устойчивости к канамицину.

Все эти вещества, за исключением TSVa130 были проанализированы в ранее созданной тест-системе *S. lividans* *aphVIII*⁺, при этом активность проявило только вещество TSV-395.

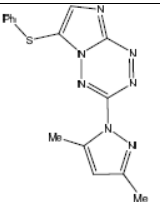
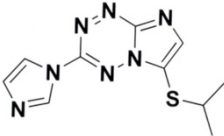
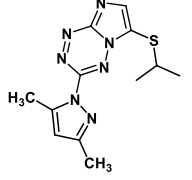
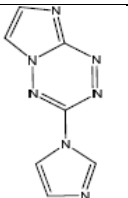
Также, часть активных в тест-системе *M. smegmatis* *aphVIII*⁺ соединений, а именно вещества TSV-402 и TSVa130 были проверены на способность ингибировать действие протеинкиназы PknA *M. tuberculosis* *in vitro*. Для реакции использована максимальная растворимая концентрация ингибитора (200 мкМ), что соответствовало молярному соотношению с количеством белка 154:1. Однако ни одно из проверенных соединений не показало достоверного отличия от отрицательного контроля, что может быть связано как с низкой активностью белка, так и с ингибированием данными соединениями в первую очередь других STPK *M. smegmatis*, что дает положительный эффект в клеточной тест-системе. При этом ни одно из отобранных соединений не ингибировало AphVIII *in vitro*.

Соединение TSV-395, как проявившее активность в двух тест-системах, было отобрано для дальнейших исследований.

Результаты молекулярного докинга показали, исследуемая молекула TSV-395 может образовывать водородные связи с остатком лизина (Lys42) в АТФ-связывающем кармане PknA *M. tuberculosis*, вследствие чего она может выступать в

роли конкурентного ингибитора данного фермента, что свидетельствует о специфическом взаимодействии ингибитора с ферментом.

Таблица 3. Зависимость уровня устойчивости к канамицину *M. smegmatis* *aphVIII*⁺ от действия соединений класса триазолотетразинов. Диаметр зоны вокруг диска с канамицином (350 мкг/диск) – 9,25±0,65 мм.

Обозначение	Молекулярная формула ингибитора	Молекулярная масса	Количество, нмоль/диск	Зона ингибирования роста комбинации канамицина и исследуемого вещества, мм
TSV-402		323,38	5	11,5±0,71
TSVa130		261,00	25	13,75±0,35
TSV-395		289,36	50	13,25±1,06
TSV-409		187,16	50	12,75±0,35

Было показано, что соединение TSV-395 обладает бактериостатической активностью в отношении штаммов *M. tuberculosis* как чувствительного, так и штамма с МЛУ, с МИК 1 мкг/мл, приводя к полному подавлению роста культуры на протяжении всего срока эксперимента, а минимальная бактерицидная концентрация для данного соединения составила 100 мкг/мл.

Также обнаружен синергический эффект TSV-395 и рифампицина: при совместном действии препаратов на штамм с МЛУ, необходимая концентрация рифампицина снижалась в два раза с 200 мкг/мл до 100 мкг/мл.

При исследовании активности TSV-395 в системе *ex vivo* инфицированных макрофагов, было установлено, что препарат активен в концентрации 5 мкг/мл, при этом токсичность наблюдалась в концентрациях от 25 мкг/мл и выше.

По результатам проведенного отбора, соединение TSV-395 было выбрано для дальнейших доклинических испытаний, которые были успешно выполнены за рамками данной работы в 2011-2013 годах.

Среди 192 веществ класса аминопиридинов и аминопиримидинов для 53 веществ удалось подобрать субингибирующие концентрации до 100 нмоль/диск, из которых 22 показали активность в бактериальной тест-системе и были отобраны для дальнейшего исследования.

Все отобранные соединения проявили ингибирующую активность в отношении белка PknA *M. tuberculosis in vitro* на уровне стандартного ингибитора СТПК LCTA-1389, а два соединения с наивысшей активностью превзошли этот показатель: 1H11 ($26,9 \pm 6,1\%$) и 2G12 ($23,2 \pm 2,0\%$), при этом ни одно из них не ингибировало *in vitro* белок AphVIII.

Для отобранных соединений были проведены исследования токсичности на клетках ФЭЧ-4, в результате которых вещества разделились на три группы, в соответствии со степенью их токсичности: сильно токсичные (<10 мкг/мл), среднетоксичные (от 10 до 50 мкг/мл) и слаботоксичные (>50 мкг/мл).

В результате исследований, отобраны три вещества, проявившие наибольшую активность в тест-системе *M. smegmatis aphVIII+*, на белке PknA *in vitro* и проявившие наименьшую токсичность, для дальнейшей разработки, как потенциальные противотуберкулезные препараты, ингибиторы микобактериальных СТПК (рис. 7).

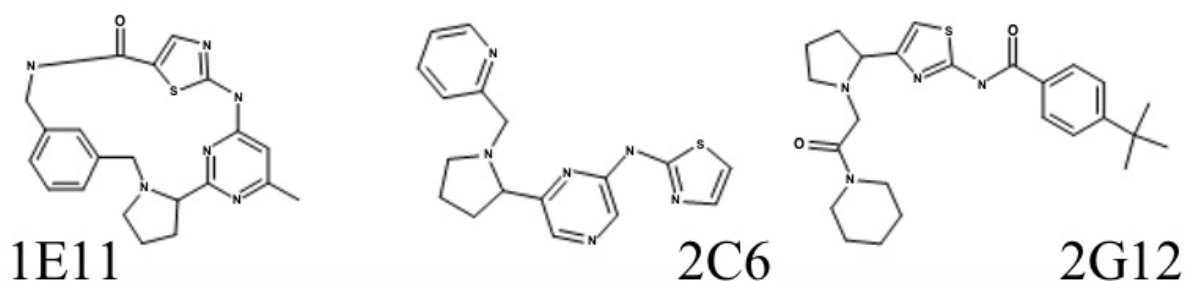


Рисунок 7. Химические формулы отобранных соединений класса аминопиридинов и аминопиримидинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы создана тест-система на основе штамма *M. smegmatis mc² 155* и гена аминогликозидфосфотрансферазы типа VIII *S. rimosus*, для отбора ингибиторов СТПК микобактерий, в том числе *M. tuberculosis*. Комплексный биоинформатический анализ показал, что *M. smegmatis* является подходящей моделью для отбора ингибиторов шести СТПК *M. tuberculosis* (в том числе жизненно-важных): PknA, PknB, PknF, PknG, PknK и PknL. Также установлен предположительный механизм функционирования тест-системы и, соответственно, основные биомишени отбираемых ингибиторов, среди которых PknA *M. tuberculosis*.

Разработанная система *in vitro* контролей к клеточной тест-системе и проведенный в этой системе отбор активных ингибиторов микобактериальных СТПК среди соединений двух классов, а также подтверждение активности одного из отобранных соединений на *M. tuberculosis* и его последующие доклинические исследования, показали практические перспективы использования сконструированной тест-системы для первичного отбора новых противотуберкулезных препаратов, сочетающего в себе плюсы клеточного и *in vitro* путей скрининга противотуберкулезных препаратов.

В качестве дальнейшего развития результатов проведенного исследования и оптимизации сконструированной тест-системы, возможно уточнение механизма ее действия путем *in vitro* тестирования отобранных веществ на СТПК MSMEG_5513 и других, а также оптимизация очистки белка PknA для повышения его конечной активности.

Также новые направления для исследований открывает возможность дальнейшего мутагенеза *aphVIII* с целью его узнавания другими микобактериальными СТПК.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что *M. smegmatis* является подходящей моделью, для исследования (в том числе для поиска ингибиторов) шести СТПК *M. tuberculosis*: жизненно-важных PknA, PknB и PknG, а также PknF, PknK и PknL;
2. Создана тест-система *M. smegmatis aphVIII+*, валидированная со стандартными ингибиторами СТПК и способная отбирать активные ингибиторы микобактериальных СТПК;
3. Показано, что СТПК MSMEG_5513 фосфорилирует APHVIII, обеспечивая работоспособность тест-системы, а отбираемые ингибиторы действуют также на СТПК MSMEG_0030 (PknA), обеспечивая антимикобактериальное действие;
4. *In vitro* показано, что мишенью отбираемых в тест-системе ингибиторов действительно является СТПК PknA *M. tuberculosis*, а не белок APHVIII;
5. В сконструированной тест-системе отобраны 4 активных ингибитора класса триазолотетразинов, один из них (TSV-395) проявил антимикобактериальную активность на *M. tuberculosis* H37Rv и МЛУ-штамме, и 22 активных ингибитора класса аминопиридинов и аминопиримидинов, среди которых 3 отличаются сравнительно высокой активностью и сравнительно низкой токсичностью.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

В журналах рекомендованных ВАК и иностранных рецензируемых журналах:

1. **Maslov D.A.** Resistance to pyrazinamide in Russian Mycobacterium tuberculosis isolates: pncA sequencing versus Bactec MGIT 960. / **D.A. Maslov**, M.V. Zaïchikova, L.N. Chernousova, K.V. Shur, O.B. Bekker, T.G. Smirnova, E.E. Larionova, S.N. Andreevskaya, Y. Zhang, V.N Danilenko // Tuberculosis (Edinb) – 2015 – 95(5) – Pp. 608–612.
2. Bekker O.B. Synthesis and activity of (+)- and (-)-usnic acid derivatives containing 1,3-thiazole cycle against Mycobacterium tuberculosis / O.B. Bekker, D.N. Sokolov, O.A. Luzina, N.I. Komarova, Y.V. Gatilov, S.N. Andreevskaya, T.G. Smirnova, **D.A. Maslov**, L.N. Chernousova, N.F. Salakhutdinov, V.N. Danilenko // Medicinal Chemistry Research – March 2015 – DOI 10.1007/s00044-015-1348-2.
3. Елизаров С.М. Идентификация сайтов фосфорилирования аминокликозидфосфотрансферазы VIII Streptomyces rimosus / С.М. Елизаров, М.Г. Алексеева, Ф.Н. Новиков, Г.Г. Чилов, **Д.А. Маслов**, А.А. Штиль, В.Н. Даниленко // Биохимия – 2012 – т.77 – вып.11 – С.1504-1512.

Патенты по теме исследования:

1. **Маслов Д. А.**, Беккер О.Б., Даниленко В. Н. Тест-система *Mycobacterium smegmatis aphVIII+* для скрининга ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ эукариотического типа. // Патент РФ № 2566998, от 27.10.2015.
2. Беккер О.Б., Даниленко В.Н, Ишметова Р.И., Коротина А.В., **Маслов Д. А.**, Русинов Г.Л., Толщина С.Г., Чарушин В.Н. Противотуберкулезное лекарственное средство: композиция имидазо[1,2-В]тетразина с пиразтнамидом. // Патент РФ № 2545458, от 27.03.2015
3. Беккер О.Б., Даниленко В.Н., Ишметова Р.И., **Маслов Д.А.**, Русинов Г.Л., Толщина С.Г., Чарушин В.Н. Замещенные азоло[1,2,4,5]тетразины – ингибиторы актинобактериальных серин-треониновых протеинкиназ.] // Патент РФ № 2462466, от 27.09.2012.

Участие в конференциях с докладами по теме исследования:

1. **Маслов Д.А.**, Беккер О.Б., Алексеева М.Г., Даниленко В.Н. Ингибиторы микобактериальных серин-треониновых протеинкиназ классов аминопиримидинов и аминопиридинов – потенциальные противотуберкулезные препараты нового поколения. // Структура и динамика молекулярных систем: сб. тезисов докладов и сообщений на XXIII Всерос. конф. – Москва : ИФХЭ РАН, 2016, с. 87-88.
2. Беккер О.Б., Кравченко М.А., **Маслов Д.А.**, Даниленко В.Н. Отбор кандидатов в потенциальные противотуберкулезные препараты среди соединений классов аминопиримидинов и аминопиридинов. // Структура и динамика молекулярных систем: сб. тезисов докладов и сообщений на XXIII Всерос. конф. – Москва : ИФХЭ РАН, 2016, с. 14.
3. **D.A. Maslov**, O.B. Bekker, T.G. Smirnova, E.E. Larionova, S.N. Andreevskaya, L.N. Chernousova, Y. Zhang, V.N. Danilenko. Resistance to pyrazinamide in Russian

Mycobacterium tuberculosis isolates. // Speaker Papers by The 2015 TB SUMMIT European Scientific Conferences, United Kingdom, London, March 23-26, 2015.

Устный доклад Маслова Д.А.

4. Bekker O.B., **Maslov D.A.**, Danilenko V.N. *M. smegmatis* *aphVIII+* Test-System For Primary Screening Of Mycobacterial Serine/Threonine Protein Kinase(S) Inhibitors. // The 2015 TB SUMMIT, European Scientific Conferences, United Kingdom, London, March 23-26, 2015. **Постерный доклад.**
5. **Маслов Д.А.**, Беккер О.Б., Мавлетова Д.А., Черноусова Л.Н., Андреевская С.А., Русинов Г.Л., Чарушин В.Н., Даниленко В.Н. Отбор и доклинические испытания азолотетразина ТАТ-395 — противотуберкулезного вещества, ингибитора протеинкиназы PknB // Сб. тезисов II конгресса национальной ассоциации фтизиатров. Ноябрь 2013 г. СПб., 2013. 268 с. **Пленарный доклад Маслова Д.А.**
6. **Maslov D**, Zhukova Y, Bekker O, Alekseeva M, Danilenko V. 2013. Developing a *Mycobacterium smegmatis* based test-system for screening mycobacterial protein kinase PknB inhibitors-potential next generation anti-tuberculosis drugs. // FEBS JOURNAL 280 (Suppl. 1):280–281. **Постерный доклад.**

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность зав. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, д.б.н., проф. **Валерию Николаевичу Даниленко** и с.н.с. лаб. генетики микроорганизмов ИОГен РАН, к.б.н. **Ольге Борисовне Беккер** за наставничество и вдумчивое руководство работой.

Автор также выражает благодарность всему коллективу лаборатории генетики микроорганизмов за постоянную поддержку, а в частности:

Марии Георгиевне Алексеевой, Диларе Анваровне Мавлетовой и Людмиле Михайловне Князевой за помощь на разных стадиях выполнения работы;

Наталье Владимировне Захаревич за помощь в освоении биоинформатических методов;

Ксении Михайловне Климиной и Кириллу Владимировичу Шуру.

Автор благодарит н.с. лаборатории медицинской химии Химического Факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, к.х.н. **Дмитрия Ивановича Осолодкина** и коллектив Отдела Микробиологии Центрального Научно-Исследовательского Института Туберкулеза, в частности: зав. отделом, д.б.н., проф. **Ларису Николаевну Черноусову** и с.н.с., к.м.н. **Татьяну Геннадьевну Смирнову.**

Отдельно автор выражает благодарность зав. лаб. функциональной геномики ИОГен РАН, к.б.н. **Сергею Александровичу Брускину** и в.н.с. лаб. структуры и функции генов человека ИБХ РАН, д.б.н. **Татьяне Леодоровне Ажикиной** за ценные замечания, сделанные при рецензировании данной работы перед ее апробацией.