



«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора ГосНИИгенетика

Бебуров Михаил Юрьевич

8 ноября 2016 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

**О научно-практической ценности диссертации Дмитрия Антоновича Маслова на тему «Создание тест-системы для отбора ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ микобактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.**

Разработка новых противотуберкулезных лекарств – комплексный междисциплинарный процесс, в котором задействованы химические и биологические подходы, а также подходы компьютерного моделирования. Применяемые в последнее десятилетие алгоритм разработки лекарств, основанный на биомишень-направленном скрининге *in vitro* оказался несколько ограниченным в отношении туберкулеза: большая часть препаратов, успешно поражающая целевые белки *in vitro*, не оказывала антибактериального действия в силу разных причин, одна из которых – слабая проницаемость клеточной стенки микобактерий. В связи с этим, в последние годы основным вновь стал скрининг препаратов на клеточных системах, хотя при таком подходе остается необходимость в установлении биомишеней для отобранных соединений.

Диссертационная работа Д. А. Маслова посвящена разработке теоретических и практических основ создания тест-системы для отбора ингибиторов серин-треониновых протеинкиназ (СТПК) эукариотического типа микобактерий. Предложенная тест-система призвана совместить преимущества скрининга на бактериальной клеточной культуре, и мишень-направленного скрининга, позволяя вести отбор одновременно по антимикобактериальной активности, и по способности поражать определенную биомишень, в данном случае – СТПК.

### ***Актуальность темы диссертации***

На сегодняшний день туберкулез является одним из наиболее социально значимых заболеваний, ежегодно унося более миллиона жизней во всем мире. Базовый курс химиотерапии туберкулеза включает в себя коктейль из четырех препаратов первого ряда, а его длительность составляет шесть месяцев, однако лечение может осложняться при инфекции штаммами возбудителя (*Mycobacterium tuberculosis*) с множественной и

широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ – устойчивость к рифампицину и изониазиду; ШЛУ – МЛУ с дополнительной устойчивостью к фторхинолонам и одному инъекционному препарату). В случае инфекции штаммом МЛУ или ШЛУ, применяются более токсичные препараты второго ряда, а курс лечения продлевают до двух лет.

Широкое распространение штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ и ШЛУ получило, в том числе, в связи с длительным применением одного и того же набора препаратов: недавно принятый к клиническому использованию бедаквелин стал первым новым противотуберкулезным препаратом впервые за 40 лет.

Разработка новых противотуберкулезных препаратов, действующих на новые биомишени и, тем самым, преодолевающих МЛУ и ШЛУ, представляется крайне актуальной на сегодняшний день.

Фосфорилирование белков по аминокислотным остаткам серина и треонина является важнейшим механизмом сигнальной трансдукции у про- и эукариот, а серин-треониновые протеинкиназы (СТПК) эукариотического типа, осуществляющие это фосфорилирование и контролируемые у микобактерий такие процессы жизнедеятельности, как рост и деление клетки, вирулентность, персистенция и природная лекарственная устойчивость к антибиотикам, являются привлекательными биомишенями.

#### **Новизна исследований**

В диссертационной работе Д.А. Маслова, направленной на конструирование генно-инженерными методами штамма *M. smegmatis aphVIII+*, экспрессирующего ген аминокликозидфосфотрансферазы типа VIII (*aphVIII*) *Streptomyces rimosus*, активность которого зависит от степени его фосфорилирования СТПК, и на исследование возможности его использования для мишень-направленного отбора ингибиторов микобактериальных СТПК, получены следующие новые приоритетные результаты:

1. Впервые показана возможность использования бактерий *M. Smegmatis*, экспрессирующих ген аминокликозидфосфотрансферазы типа VIII (*aphVIII*) из *Streptomyces rimosus* в качестве модели для поиска ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*, в частности, жизненно-важных PknA, PknB и PknG, а также PknF, PknK и PknL;
2. Предложена модель фосфорилирования аминокликозидфосфотрансферазы типа VIII (*aphVIII*) с помощью ферментов СТПК *M. smegmatis*, что позволило обосновать схему отбора ингибиторов в созданной тест-системе;

3. Впервые проведены *in vitro* исследования влияния ингибиторов различных химических классов (бис-индолилмалеимиды, азолотетразины, аминопиридины и аминопиримидины) на канамицинкиназную активность белка AphVIII;

4. В созданной системе отобрано одно соединение класса азолотетразинов, активное в отношении как лекарственно-чувствительного штамма *M. tuberculosis*, так и штамма с МЛУ, а также ряд соединений классов аминопиридинов и аминопиримидинов, для дальнейшей разработки в качестве кандидатов в противотуберкулезные препараты нового поколения.

Проведенные Д.А. Масловым исследования, позволили сконструировать и успешно валидировать новую тест-систему для мишень-направленного отбора ингибиторов микобактериальных СТПК, совмещающую в себе плюсы клеточного и *in vitro* поиска новых противотуберкулезных препаратов.

***Степень обоснованности задач, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации***

Задачами работы являются исследование возможности использования быстрорастущей непатогенной *M. smegmatis* в качестве модели для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*, непосредственно создание тест-системы генно-инженерными методами и ее валидация, установление основных СТПК, участвующих в фосфорилировании AphVIII, *in vitro* исследование ингибирования киназной реакции СТПК-мишени и отбор ингибиторов микобактериальных СТПК в созданной тест-системе из библиотек новых химических соединений. Задачи четко сформулированы и обоснованы. Эксперименты выполнены на высоком методическом уровне, с использованием современных методов генетики, молекулярной биологии и биоинформатики. Выводы работы обоснованы, соответствуют целям и задачам исследования и основаны на полученных в ходе работы результатах.

Диссертация Д.А. Маслова построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список использованной литературы.

Материал диссертации изложен на 148 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 32 иллюстрации. Список цитируемой литературы состоит из 226 работ.

Обзор литературы состоит из четырех глав. В первой главе раскрывается проблема лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*. Описаны генетические механизмы устойчивости к используемым и разрабатываемым противотуберкулезным препаратам. В главе 2 описываются бактериальные СТПК эукариотического типа. Дана общая характеристика их строения и функционирования, приведены примеры участия СТПК в процессах жизнедеятельности различных бактерий. В главе 3 в деталях рассмотрены известные данные о СТПК и фосфатазе *M. tuberculosis*, обосновано рассмотрение СТПК *M. tuberculosis*, как привлекательных биомишеней. Глава 4 посвящена тест-системам для отбора ингибиторов СТПК на основе белка AphVIII. Обзор литературы в полной мере предоставляет необходимые знания для понимания диссертационной работы. В целом раздел «Обзор литературы» свидетельствует о широте кругозора и хороших знаниях диссертантом объекта исследования. Вместе с тем, в тексте присутствуют многочисленные грамматические небрежности, например:

стр.49 - «...рассматривается новая стратегия борьбы с туберкулезом, основанная на снижении его вирулентности»,

«...проявляет активность как на различные протеинкиназы человека, так и на...»

стр.50 - «отличающиеся аминокислотные остатки показаны палками, одинаковые – линиями».

В главе 5 «Материалы и методы» приведено детальное описание используемых в работе методик, демонстрирующее, что автор владеет различными современными подходами в области биоинформатики, микробиологии, молекулярной генетики и геной инженерии. Замечание к этой части работы связаны с описанием процедуры «Валидация». Согласно общепринятым правилам под валидацией понимается комплекс исследований, включающих устойчивость, повторяемость, надежность и т.п. В то же время, автор использует ряд исследований, которые скорее можно было бы назвать «оценка пригодности» тест – системы.

Глава 6 «Результаты и обсуждение» состоит из 4 разделов. В первом исследуется возможность использования *M. smegmatis* в качестве модели для отбора ингибиторов СТПК *M. tuberculosis*. Различными биоинформатическими методами анализируется структура генов и кодируемых ими белков СТПК *M. smegmatis*, проводится их сравнение с белками СТПК *M. tuberculosis*. На основе проведенного анализа делается вывод о том, что *M. smegmatis* является подходящей моделью для отбора ингибиторов шести СТПК *M. tuberculosis*, в том числе и жизненно-важных PknA и PknB.

В следующем разделе описано непосредственно конструирование тест-системы: выбор оптимального экспрессионного вектора для экспрессии гена *aphVIII* в клетках *M. smegmatis*, молекулярное клонирование, анализ экспрессии гена *aphVIII* по уровню устойчивости клеток к канамицину, подбор оптимальных условий для работы с тест-системой и ее валидация со стандартными ингибиторами СТПК. Вместе с тем, представляется целесообразным для более полной характеристики созданной тест-системы получить прямые доказательства повышения устойчивости к канамицину клеток *M. smegmatis* при фосфорилировании продукта гена *aphVIII*.

В работе также показано, что тест-система способна селективно отбирать активные ингибиторы СТПК, однако, ингибиторы СТПК RknB в ней отобрать невозможно. Сайт-направленным мутагенезом были созданы мутантные варианты AphVIII с сайтом фосфорилирования Ser-146 и областью вокруг сайта, адаптированной под область узнавания протеинкиназой RknB, однако экспрессия гена *pknB* в клетках *E. coli* привела к ингибированию их роста, что не позволило оценить фосфорилирование AphVIII протеинкиназой RknB при коэкспрессии их генов.

Для идентификации основных СТПК, участвующих в фосфорилировании AphVIII в клетках *M. smegmatis*, Дмитрием Антоновичем проведен анализ последовательностей сайтов субстрат-связывания СТПК *M. smegmatis*. На основе этого анализа отобраны два основных кандидата – MSMEG\_5513 и MSMEG\_5437. Последняя – известный регулятор природной лекарственной устойчивости *M. smegmatis*, обеспечивающий, в том числе, устойчивость микобактерий к хлорамфениколу и изониазиду. Однако тест с бумажными дисками не показал синергического эффекта хлорамфеникола и изониазида в сочетании с отбираемыми в тест-системе ингибиторами. Автором предложена схема функционирования тест-системы, согласно которой AphVIII фосфорилируется киназой MSMEG\_5513, а отбираемые ингибиторы поражают не только указанную киназу, но и RknA, которая имеет АТФ-связывающий карман (область, с которой связывается ингибитор), того же класса, что и MSMEG\_5513.

В завершение, автором проведен отбор ингибиторов микобактериальных СТПК из библиотек новых химических соединений классов азолотетразинов, аминопиридинов и аминопиримидинов. Отобраны 4 активных ингибитора класса триазолотетразинов, один из них (TSV-395) проявил антимикобактериальную активность как по отношению к чувствительному штамму *M. tuberculosis*, так и к штамму с МЛУ, и 22 активных ингибитора класса аминопиридинов и аминопиримидинов, среди которых 3 отличаются

сравнительно высокой активностью и сравнительно низкой токсичностью. *In vitro* показано, что отобранные соединения ингибируют киназную активность PknA *M. tuberculosis*, и не ингибируют активность AphVIII.

Работа является законченным самостоятельным исследованием, в котором разработана тест-система для отбора ингибиторов микобактериальных СТПК – потенциальных противотуберкулезных препаратов нового поколения, и продемонстрирована возможность ее успешного использования.

#### ***Научно-практическая значимость работы***

В работе впервые создана и охарактеризована тест-система на основе быстрорастущей непатогенной микобактерии *M. smegmatis*, экспрессирующей ген *aphVIII* *S. rimosus*, для отбора ингибиторов микобактериальных серин-треониновых СТПК. Тест-система совмещает в себе плюсы отбора потенциальных противотуберкулезных препаратов на клеточном уровне с мишень-направленным скринингом *in vitro*. На примере библиотек соединений классов азолотетразинов, аминопиридинов и аминопиримидинов показана возможность первичного отбора (прескрининга) мишень-специфичных противотуберкулезных препаратов, соответствующих современным предъявляемым требованиям, в том числе преодолевающих проблему лечения туберкулеза, вызванного МЛУ-штаммами *M. tuberculosis*, что представляет значительный интерес для научных организаций, разрабатывающих новые лекарственные препараты для лечения туберкулеза.

#### ***Конкретные рекомендации по использованию результатов***

Результаты работы Д.А. Маслова представляют несомненную значимость для поиска новых препаратов для химиотерапии туберкулеза, а именно для разработки новых противотуберкулезных препаратов, способных преодолевать проблему МЛУ и ШЛУ *M. tuberculosis*. Сконструированная тест-система может быть использована, в первую очередь, для предварительного отбора кандидатов в противотуберкулезные препараты из библиотек соединений, синтезируемых различными научными организациями и предприятиями (ИОС УрО РАН, НИИНА им. Г.Ф. Гаузе, ИОХ РАН, НИОХ СО РАН).

Отбор в созданной тест-системе соединений при этом является начальным этапом, позволяющим существенно сузить библиотеки исследуемых соединений до небольшого количества веществ, обладающих антимикобактериальным действием и мишень-специфичностью, что не исключает необходимости дальнейшей разработки отобранных соединений в рамках доклинических испытаний, в частности тестирования их антибактериального действия на *M. tuberculosis* и токсичности.

По результатам работы опубликованы 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также 3 патента РФ. Результаты диссертации были представлены на 5 конференциях, из которых 2 – международные. Содержание автореферата диссертации соответствует содержанию диссертации.

Диссертация Дмитрия Антоновича Маслова, представленная на соискание ученой степени кандидата наук, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. Научная и практическая значимость работы не вызывает сомнений. Сделанные автором выводы соответствуют тексту работы и поставленным задачам.

Диссертация Дмитрия Антоновича Маслова полностью соответствует всем требованиям, представленным в «Положении о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением правительства РФ от 24.09.2013 №842), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Биоресурсного центра ГосНИИгенетика, протокол № 11\2016 от 3 ноября 2016 г.

Заместитель директора по научной работе

Государственного научного центра РФ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский

институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

(117545 Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

[www.genetika.ru](http://www.genetika.ru), тел. 8(495)3151247,

e-mail составителя: [yanenko@genetika.ru](mailto:yanenko@genetika.ru) )

доктор биологических наук, профессор



Яненко Александр Степанович

Подпись д.б.н., профессора Яненко А.С. заверяю

Ученый секретарь

Государственного научного центра РФ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский

институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»,

кандидат химических наук



Яроцкий Сергей Викторович

