

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 связано 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, тел. 8(495)3151247,

e-mail составителя: 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

