

Отзыв официального оппонента д.б.н. Каратаева Геннадий Ивановича

о диссертационной работе ВАТЛИНА Алексея Александровича

«Исследование генетических механизмов устойчивости и чувствительности штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность тематики диссертационной работы А.А. Ватлина не вызывает сомнения так как проведённое исследование решает важную практическую и фундаментальную задачу - изучение механизмов возникновения устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Во Введении четко прописаны актуальность темы исследования, степень ее проработанности, сформулированы цель и задачи исследования, даны основные положения о научной новизне, практическом значении полученных результатов, приведены положения, выносимые на защиту, а также список публикаций соискателя.

Литературный обзор в целом дает достаточно полное представление о механизмах возникновения устойчивости к макролидным антибиотикам, механизмах действия антибиотиков различных химических классов, характеризует известные биомишени для действия олигомицина А и современные подходы в области поиска новых лекарственных средств. Обзор литературы хорошо структурирован и проиллюстрирован.

Основной целью диссертационной работы является отбор и молекулярно-генетическая характеристика мутантов устойчивых к олигомицину А и его синтетическим производным у бактерий *S. fradiae* ATCC 19609. Олигомицин А интересен как противоопухолевый препарат, а его аналоги демонстрируют хорошую активность в отношении Грам+ бактерий. Однако, высокая токсичность антибиотика, ограничивает

возможности его использовать в качестве лекарственного средства. Определение мишеней для олигомицина А и его аналогов позволит установить механизм его действия на опухолевые и бактериальные клетки и разработать новые лекарственные препараты.

Выбор микроорганизмов *S. fradiae* ATCC 19609 в качестве объекта исследования обусловлен их высокой природной чувствительностью к олигомицину А и некоторым другим макролидам. В обзоре литературы приводятся результаты исследований, позволяющих предположить, что высокая чувствительность *S. fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А может быть связана с наличием нескольких мишеней приложения активности антибиотика в клетках стрептомицетов, тогда как в настоящее время охарактеризована только одна такая мишень - FoF1-АТФ-синтаза. Обзор содержит подробную информацию о структуре и каталитической функции АТФ-синтазы. Показано, что важнейшей мишенью для ингибиторов является С-субъединица FoF1-АТФ-синтазы. Приведена информация о сайтах связывания олигомицина А и его производных с С-субъединицей фермента.

Неудачные попытки селекции мутантов, резистентных к олигомицину А, позволили автору сформулировать задачу поиска мутантов резистентных к полусинтетическим макролидам, полученным в результате модификации природного антибиотика. Производные, представляющие собой молекулы олигомицина А, модифицированные по различным фрагментам кольцевой молекулы антибиотика были синтезированы в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе. Среди них были производные, модифицированные по сайту связывания антибиотика с FoF1-АТФ-синтазой. Предполагалось, что модификация сайта связывания с АТФ-синтазой позволит выявить другие возможные мишени антибиотика и отобрать резистентные к полусинтетическим производным олигомицина А варианты *S. fradiae* ATCC 19609. Мутации, обеспечивающие резистентность, могут быть локализованы, например, в генах, кодирующих фермент, инактивирующий антибиотик, субъединицы рибосомы, в генах

ответственных за транспорт антибиотика или в генах, обеспечивающих синтез и/или репарацию ДНК.

Исследовав около 20 изомеров олигомицина А, автор выбрал два производных (3S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицина (Olg4) и нитрон-олигомицин (Olg1) и отобрал резистентные к ним мутанты *S. fradiae* ATCC 19609. Для идентификации мутантных генов было проведено полногеномное секвенирование мутантных и нативных геномов и их биоинформационный анализ. Мутант Olg 4 содержал единичную нуклеотидную замену С (1797)Т в гене хеликазы (KDS85476.1) NCBI, которая привела к замене аминокислоты А(600)Т в консервативном регионе P-loop NTPase. Обнаружено снижение чувствительности мутанта Olg 4 к ксенобиотикам. В мутанте *S. fradiae-nitR⁺bld* выявлена точечная мутация сопровождающаяся заменой Н(24)R в ДНК - связывающем консервативном районе, входящем в суперсемейство НТН в белке полифункционального транскрипционного регулятора двойного действия PadR (KDS89815.1). Сравнительный протеомный анализ визикул мутантного и дикого штаммов выявил количественное увеличение двух ABC транспортёров у мутантных клеток. Аналогичные результаты получены при количественном анализе транскрипции генов транспортёров, что подтверждало детерминированность фенотипа *nitR⁺bld S. Fradiae* заменой Н(24)R.

Функциональный анализ гена *padR* показал, что он, возможно, вовлечен не только в процесс регуляции отдельных генов устойчивости (MDR-транспортёры), но и в регуляцию генов, участвующих в спорообразовании стрептомицетов. Автор предложил схему регуляции генов, вовлеченных в процесс спорообразования и выведения антибиотика из клетки, контролируемых PadR, и возможный механизм формирования устойчивости к производным олигомицина А.

Проанализировав фундаментальные результаты работы, автор сделал заключение, что идентифицированная мутация в гене хеликазы IV,

обуславливающая устойчивость к (33S)-33-дезоксигантисмицину, может оказаться полезной для повышения стабильности продукции тилозина в новом варианте штамма-производителя. Дальнейшая разработка этой идеи станет ещё одним примером использования фундаментальных знаний для целей практической биотехнологии, что ещё раз подчёркивает актуальность и практическую значимость подобных исследований вообще и настоящей работы в частности.

Таким образом, в результате проделанной работы автору удалось не только отобрать мутанты *S. fradiae* резистентные к производным олигомицина А, выявить и идентифицировать гены, обеспечивающие устойчивость к производным олигомицина А, определить возможные дополнительные функции генов стрептомицетов, ответственные за спорообразование, но и сформулировать перспективность использования одного из мутантов в качестве более стабильного производного тилозина.

Представленные в работе результаты позволяют заключить, что автор владеет большим числом экспериментальных методов, в том числе, биохимическими методами определения ферментативной активности, микробиологическими методами отбора и характеристики мутантных микроорганизмов, молекулярно-генетическими методами протеомики и количественного анализа транскрипции генов. Прделана большая методическая работа по полногеномному секвенированию, секвенированию фрагментов генома по Сенгеру, аннотации полученных последовательностей.

Работа представляется логически завершённой. Цель исследования достигнута. Выделены и охарактеризованы резистентные к антибиотикам мутанты *S. fradiae* ATCC 19609, определены мутации, приводящие к возникновению устойчивости к производным олигомицина А, сформулирован возможный механизм возникновения устойчивости штаммов к двум производным олигомицина А.

Рукопись диссертации представлена на 143 страницах машинописного текста и построена по общепринятому плану и содержит следующие разделы: оглавления, введения, пять глав обзора литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список используемых сокращений, список цитируемой литературы, 1 приложение. Работа включает 13 таблиц и 29 рисунков. Библиографический список включает 187 публикаций.

По результатам диссертационной работы автором опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в международных базах данных и рекомендованных ВАК. Фрагменты представленного исследования докладывались на российских и международных научных конференциях.

Постановка цели и задач исследования, использованные в работе методы, последовательность и логика аргументации при обсуждении полученных результатов не вызывают серьёзных замечаний, однако работа не лишена недостатков. Так как основная цель обзора литературы обычно направлена на обоснование формулировки и целей исследования хотелось бы видеть более четкие резюме хотя бы после каждой главы Обзора. Нуждается в упорядочивании использование некоторых терминов. Иногда в одном предложении, используются термины высокая «чувствительность» и низкая «устойчивость» мало чем отличающихся друг от друга. Присутствуют жаргонные не вполне понятные выражения, например «функциональные свойства относительно АТФ синтазы бактерий»; «эукариотические штаммы», «олигонуклеотиды создавали при помощи...» «аминокислотных последовательностей генов». В тексте встречаются необоснованные повторы и другие стилистические погрешности, На мой взгляд, не вполне удачен термин тест-система применительно к *S. fradiae* ATCC 19609.

При изложении результатов исследования не дано чёткого обоснования выбора именно производных Olg4 и Olg1 для получения резистентных мутантов. Большинство сделанных замечаний носит технический или

стилистический характер и не снижают хорошего впечатления о проведённой работе.

Заключение о научно-практической ценности работы и ее соответствие требованиям ВАК

Диссертационная работа Ватлина А.А. представляет собой самостоятельное законченное научное исследование, в котором решаются задачи, имеющие важное практическое и фундаментальное значение для генетики и микробиологии. Достоверность и обоснованность экспериментальных результатов и выводов не вызывает сомнения. В целом, работа соответствует требованиям ВАК РФ и Постановления Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г «О порядке присуждения научных степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Ватлин Алексей Александрович, безусловно, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07. – Генетика.

Каратаев Геннадий Иванович

заведующий лаборатории генетики бактерий, д. б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Минздрава России г. Москва (ФГБУН ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ России)

123098, г. Москва, ул.Гамалеи, дом 18.

Телефон, 8 499 193 61 90; email: karataevgi@rambler.ru

4 мая 2017 г.

