

УТВЕРЖДАЮ
Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова,
А.А.Федянин



_____ 2017 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию соискателя **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

Исследование генетических механизмов устойчивости – комплексный междисциплинарный процесс, в котором задействованы химические и биологические подходы, а также современные методы биоинформатики. Олигомицин А и его аналоги являются высокоперспективными химическими соединениями, которые проявляют высокую противоопухолевую и антиактиномикозную активность, однако высокая токсичность данных соединений не позволяет использовать их в клинической практике. Таким образом, изучение активности новых производных олигомицина А и исследование генетических механизмов устойчивости к этим химическим соединениям является актуальной темой исследования для современной науки.

Диссертационная работа Ватлина А.А. посвящена изучению активности новых полусинтетических производных олигомицина А и поиску их биомишеней с использованием сверхчувствительного штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609. Данный штамм является

сверхчувствительным к большинству известных антибиотиков, в особенности к олигомицину А (<0.001 нмоль/мл), что позволяет использовать его для поиска новых биомишеней олигомицина А и его производных.

Актуальность темы диссертации

Разработка и поиск новых противоопухолевых и антиактиномикозных препаратов представляется крайне актуальной на сегодняшний день. Однако к современным лекарственным средствам предъявляют ряд жестких требований, а именно высокая активность и низкая токсичность. Все эти требования напрямую зависят от установления биомишени конкретного препарата, ведь именно мишенеспецифичность, как изначальная, так и повышенная в результате рациональной оптимизации молекулярной структуры действующего вещества, влияет как на его активность, так и на токсичность. Олигомицин А селективно подавляет транслокацию протонов в F_0F_1 АТФ-синтазе митохондрий эукариотов и цитоплазматическом комплексе F_0F_1 АТФ-синтазы актинобактерий, что приводит к нарушению энергетического обмена. Однако, использование олигомицина А для химиотерапии инфекционных и других заболеваний ограничено его высокой токсичностью. Имеющиеся данные свидетельствуют о существовании в клетках нескольких мишеней действия олигомицина А. Поэтому для дальнейшей разработки нового поколения химиотерапевтических средств необходимо выявление всех потенциальных внутриклеточных мишеней, а также исследование механизмов резистентности бактериальных клеток к действию олигомицина и его производных.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Ватлина А. А. 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 изложена на 141 страницах машинописного текста, включает 13 таблиц и 29 рисунков. Список используемой литературы включает 187 публикаций. Введение полностью отвечает названию диссертации, в нем ясно сформулирован круг проблем, актуальность работы, практическая значимость, научная новизна и сведения, необходимые для понимания рассматриваемых вопросов.

В пяти главах обзора литературы автор подробно рассматривает механизмы действия антибиотиков различных химических классов, механизмы устойчивости к макролидным антибиотикам, в частности, к олигомицину А и его производным, известные на сегодняшний день механизмы действия олигомицина А на эукариотические и бактериальные клетки. В третьей главе подробно разбирается механизм работы АТФ-синтазы – единственной известной биомишени олигомицина А, а также механизм связывания олигомицина А и С-субъединицы FoF1-АТФ-синтазы. В четвертой главе автор описывает антибиотики группы олигомицинов и тест-систему на основе штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 для определения их активности. В последней, пятой главе литературного обзора Ватлин А.А. описывает существующие подходы для поиска новых биомишеней, и имеющиеся базы данных. Все разделы «Обзора литературы» хорошо проиллюстрированы рисунками и таблицами, а список из 187 цитированных публикация говорит о глубокой проработке автором современной научной литературы по теме исследования.

Глава «Материалы и методы» полно описывает широкий спектр классических и современных методов генетики, микробиологии и биохимии, которыми владеет автор. Сюда входят методы культивирования бактерий, методы изучения экспрессии генов, полногеномного секвенирования, современные биоинформатические методы и методы для изучения АТФ-синтазной активности в клетках.

Новизна исследований

В диссертационной работе Ватлина А.А. направленной на получение мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к олигомицину А и его синтетическим производным, и изучение механизмов устойчивости получены следующие новые приоритетные результаты:

1. Впервые выявлены гены, предположительно контролирующие устойчивость к антибиотикам *S. fradiae* ATCC 19609, - гены четырех MDR ABC транспортеров, два гена даунорубицин-устойчивого белка (DrrC, BrcA), ген устойчивости к макролидным антибиотикам macB2; пять генов непарных субъединиц пермеаз MDR ABC-транспортеров; ген MDR транспортера семейства MatE, ген транспортера семейства MFS, а также ген, кодирующий пурамицин-устойчивый белок семейства EmrB/QacA и ген MDR ABC транспортера, гомологичного гену белка Pgp человека
2. Впервые показано, что в контроль устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину вовлечен ген, кодирующий хеликазу IV, которая принимает участие в процессе репарации ДНК, а в контроль устойчивости к нитрон-олигомицину А – ген *padR*, кодирующий транскрипционный регулятор.
3. Впервые показано, что олигомицин А является слабым ингибитором синтазной активности *S. fradiae* ATCC 19609.

Проведенные Ватлиным А.А. исследования позволили обнаружить новые механизмы устойчивости к производным олигомицина А.

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

Одной из основной задачей работы является изучение молекулярных механизмов устойчивости у полученных мутантных штаммов *Streptomyces fradiae* ATCC19609 к олигомицину А и его производным с помощью транскрипционного и протеомного анализа. Задачи четко сформулированы и обозначены. Эксперименты выполнены на высоком методическом

уровне, с использованием современных методов генетики, молекулярной биологии, микробиологии и биоинформатики. Работа обладает высокой практической значимостью, а именно:

1. Впервые выявлен один из механизмов, приводящий к уменьшению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к ксенобиотикам. Для повышения стабильности продукции антибиотика могут быть сконструированы промышленные штаммы с мутацией в гене, кодирующем хеликазу IV.
2. Гены, контролирующие устойчивость к производным олигомицина А у штамма *S. fradiae* ATCC 19609 могут быть использованы при характеристике устойчивости раковых клеток в клинической практике и при создании противораковых препаратов.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 12 разделов, в которых описаны полученные автором принципиально новые данные. В первом разделе описана принципиальная схема всех экспериментов диссертационной работы. Вторая и третья глава посвящена характеристике устойчивости штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к антибиотикам различных химических классов, а также к олигомицину А и его производным. Для изучения степени ингибирования олигомицина А АТФ-синтазной активности автор проводит определение ингибирующего действия олигомицина А на активность FoF1-АТФ-синтазы в везикулах *S. fradiae* ATCC 19609. Полученные данные (олигомицин А ингибирует активность только на 30 %) позволяют предположить наличие дополнительных биомишеней олигомицина А в клетке *S. fradiae* ATCC 19609. В следующих подразделах главы «Результаты и обсуждение» автор проводит аннотацию генов устойчивости к антибиотикам в геноме *S. fradiae* ATCC 19609 и выявление их ортологов в геноме *S. lividans* TK24 и *S. albus* J1074 для поиска предполагаемых биомишеней к олигомицину А. В подразделах 8-

12 автор описывает методику получения мутантных штаммов *S. fradiae*, устойчивых к производным олигомицина А, а также результаты полногеномного секвенирования, который позволил выявить у полученных мутантов мутации в генах, продукты которых предположительно могут быть вовлечены в контроль устойчивости к олигомицину А и его производным. Автором проведен сравнительный транскрипционный анализ генов, отвечающих как за формирование воздушного мицелия, так и вовлеченных в процесс выведение антибиотика из микробной клетки.

По результатам работы опубликованы 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, Минобрнауки РФ и индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science. Результаты диссертации были представлены на 5 конференциях, из которых 2 международные.

Хотелось бы сделать одно общее замечание относительно использования автором термина «механизмы устойчивости». Автор многократно подчеркивает, что им обнаружены новые механизмы устойчивости стрептомицетов, обусловленные мутацией в гене, кодирующем хеликазу или в гене, кодирующем транскрипционный регулятор. Получается сколько мутаций в конкретном гене – столько и механизмов устойчивости. Однако сама по себе мутация не является механизмом устойчивости, тем более новым. На самом деле автор показал, что гены, кодирующие эти белки, вовлечены в контроль устойчивости к антибиотикам. Следовательно механизмы устойчивости непосредственно связаны с функцией этих белков, хеликазы и транскрипционного регулятора. А мутационный анализ позволили автору открыть эти новые механизмы устойчивости.

В экспериментальной части работы имеются многочисленные недостатки, связанные с неправильным использованием научных терминов и со стилем изложения. Отметим лишь некоторые.

1. В разделе «Материалы и методы» присутствуют подразделы «Манипуляции с нуклеиновыми кислотами» и «Манипуляции с

белками». Следует отметить, что термин «манипуляция» уместен лишь в случае использования методов генетической инженерии, когда создают рекомбинантные молекулы ДНК вне клетки. Автор такие методы не использовал. Выделение ДНК из клеток, гель-электрофорез ДНК и белков, определение концентрации ДНК и т.п. вряд ли можно назвать «манипуляциями».

2. Автор по непонятной причине названия некоторых ферментов и белков приводит на английском языке - alkaline phosphatase, leucyl aminopeptidase, alanine dehydrogenase и т.п.
3. Раздел 7.10. «Изучение функции гена хеликазы у мутантного штамма *S. fradiae* tcnR». В этом разделе приведены лишь данные о выявлении однонуклеотидной замены в гене хеликазы у одного из штаммов и о функции этого фермента вообще нет ни слова. Об изучении какой функции гена идет речь?
4. Раздел 7.10.1. «Биоинформатический анализ гена хеликазы штамма *S. fradiae* ATCC19609». Название раздела предполагает анализ нуклеотидной последовательности, на самом деле автор в этом разделе приводит анализ аминокислотных последовательностей.
5. Раздел 7.12.1. «Распространение и функции гена *padR* у Грам+ бактерий». В этом разделе приведены данные о наличии гомологов у разных бактерий, но нет ни одного слова о их функции.
6. В этом разделе автор пишет: «При проведении дальнейшего анализа полученной SNP и **генетической характеристики гена *padR*** было установлено, что гены данного семейства присутствуют у большинства бактерий». Что такое генетическая характеристика гена и каким образом дальнейший анализ однонуклеотидной замены помог автору установить присутствие гомологичных генов у большинства бактерий?
7. В этом же разделе «У представителей семейства *Streptomyces* ген *padR*, в котором был найден SNP, имеет высокую степень гомологии

по всей длине, при этом идентичность ДНК- связывающего домена составляет около 98%». Что такое высокая степень гомологии по всей длине? Что такое ДНК-связывающий домен у гена?

8. Раздел 7.12.3. Автор пишет «**Для определения количественного изменения уровня транскрипции 2 генов ABC транспортеров..... было проведено измерения их уровня транскрипции**». В этом же разделе «Относительная экспрессия генов *S. fradiae*-nitR+bld по сравнению со штаммом *S. fradiae* ATCC 19609», «экспрессия штамма дикого типа принята за единицу». Очевидно, имеется в виду исследование сравнительной экспрессии генов у разных штаммов и уровень экспрессии этих генов у штамма дикого типа был принят единицу?
9. Термин гомология автор использует неправильно и подсчитывает гомологию в процентах. Наличие гомологии указывает на общность происхождения, поэтому она либо есть, либо ее нет. Гомологии в процентном выражении не существует. При сравнении гомологичных последовательностей используют термины «сходство» и «идентичность».
10. Раздел «Заключение» содержит непонятные фразы: «Были определены МИК олигомицина А и **ряда его полусинтетических производных штамма *S. fradiae* ATCC 19609**»; «Геномы двух мутантных штаммов были депонированы в системе NCBI», «Получены данные о неизвестном ранее механизме (мутация в гене хеликазы, которая привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксигуаноцианолигомицину), который приводит к уменьшению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к ксенобиотикам».
11. Раздел «Выводы». Замечание по выводу 5 «Выявлена связь генотипа и фенотипа штамма *S. fradiae* ATCC 19609 устойчивого к нитрон-

олигомицину с мутацией в гене *radR*». О какой связи генотипа и мутации идет речь?

Вместе с тем, несмотря на ряд недостатков, диссертация Ватлина Алексея Александровича, 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.

Диссертационная работа Ватлина Алексея Александровича 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 заседании кафедры генетики, протокол № 2-17 от 28 марта 2017 года.

Заведующий кафедрой генетики,
профессор, доктор биологических наук



В.В.Зинченко

АТСС 19609. Данный штамм является

