

УТВЕРЖДАЮ:

ВРИО директора
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской Академии Наук

д.б.н.  А.М. Кудрявцев
«3»  2017 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук**

Диссертация «Исследование генетических механизмов устойчивости и чувствительности штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным» выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

В период подготовки диссертации соискатель Ватлин Алексей Александрович обучался в очной аспирантуре в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук в лаборатории генетики микроорганизмов с 2013 по 2017 год, а также работал в должности и.о. младшего научного сотрудника с апреля 2015 г. по настоящее время.

В 2013г. окончил Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, по специальности генетика.

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2017 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель – д.б.н., проф. Даниленко Валерий Николаевич, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов, Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

По итогам рассмотрения диссертации «Исследование генетических механизмов устойчивости и чувствительности штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным» принято следующее **заключение:**

Актуальность исследования:

Олигомицин А – перспективный макролидный антибиотик для противоопухолевой или антимикробной терапии, однако использование в клинической практике ограничено его токсичностью. Механизм действия олигомицина А и его аналогов у эукариотических и бактериальных клеток связывают с ингибированием клеточной активности FoF1-АТФ-синтазы путем взаимодействия с С-субъединицей, которая является высококонсервативным ферментом как у бактерий, так и у человека. Однако получение мутантов устойчивости сверхчувствительного штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 не увенчалось успехом, что привело к предположению о существовании дополнительных биомишеней олигомицина А в клетке. По имеющимся литературным данным в клетках существует несколько биомишеней олигомицина А помимо FoF1-АТФ-синтазы.

Для снижения токсичности олигомицина А и изучения механизмов чувствительности к нему в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе ведутся работы по получению новых полусинтетических производных олигомицина А, в структурах которых проводится направленное изменение функциональных групп.

Таким образом, выявление новых потенциальных внутриклеточных мишеней позволит понять природу сверхчувствительности штамма *S. fradiae*

ATCC 19609, а также исследовать механизмы возникновения устойчивости у бактерий к олигомицину А и его производным.

Научная новизна и практическая значимость исследования

Впервые проведено полногеномное секвенирование и аннотация генома штамма *S. fradiae* ATCC 19609.

Впервые выявлен механизм возникновения устойчивости к производным олигомицина А – нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину. Механизм устойчивости к нитрон-олигомицину обусловлен мутацией в гене *padR* полифункционального транскрипционного регулятора двойного действия, который может быть вовлечен в регуляцию выброса антибиотика из клетки. Охарактеризован новый механизм регуляции спорообразования и формирования мицелия у штамма *S. fradiae* ATCC 19609 транскрипционным регулятором PadR, и его роль в регуляции генов ABC – транспортеров. Установлена биомишень действия (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицина – хеликазы IV, мутация в гене которой приводит к снижению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А в 10 раз.

Штамм дикого типа *S. fradiae* ATCC 19609 и полученные мутантные штаммы, устойчивые к производным олигомицина А, могут быть использованы как комплексная тест-система для скрининга новых природных антибиотиков и их полусинтетических производных, активных в отношении патогенных штаммов бактерий, таких как *Actinomyces graevenitzi*, *A. gerencseriae*, *A. urogenitalis*, *Nocardia brasiliensis*, *Propionibacterium propionicum*, *N. asteroides*, *Streptomyces albus* и другие.

Выявлен один из механизмов устойчивости (мутация в гене хеликазы привела к возникновению устойчивости к (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину), приводящий к снижению чувствительности штамма *S. fradiae* ATCC 19609 к ксенобиотикам.

Некоторые установленные механизмы устойчивости к производным олигомицина А штамма *S. fradiae* ATCC 19609 могут быть использованы при

характеристике устойчивости раковых клеток в клинической практике и при создании противораковых препаратов.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Автором опубликовано 6 статей по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК, и в международных рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Промежуточные и итоговые результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: на Междисциплинарном Симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии (МОБИХим 2015, Новый Свет, Крым, сентябрь 2015 г.) и на встрече рабочей группы США-Россия по профилактике и лечению ВИЧ-инфекции и сопутствующих заболеваний (Санкт-Петербург, апрель 2016 г.). Доклады по теме диссертации проводились на ежегодных отчетах аспирантов ИОГен РАН в 2013-2016 гг. Апробация диссертационной работы была проведена 27 февраля 2017 г. на межлабораторном семинаре ИОГен РАН. Результаты, полученные Ватлиным А.А. достоверны и воспроизводимы.

Соответствие диссертационной работы избранной специальности

Диссертационная работа соискателя Ватлина А.А. соответствует избранной специальности 03.02.07 – генетика (согласно п. 7, 12, 13 Паспорта номенклатуры специальностей научных работников по данной специальности).

Личный вклад автора в исследование

Автор данной работы выполнил наибольшую часть исследования самостоятельно, а именно: характеристика штамма *S. fradiae* ATCC 19609, модельного объекта *S. lividans* 66 и *S. albus* ATCC 21132 по спектру устойчивости к антибиотикам различных классов, в том числе к олигомицину А и его производным; полногеномное секвенирование исходного штамма *S. fradiae* ATCC 19609 и аннотация генов устойчивости. Получение мутантных штаммов *S. fradiae* ATCC 19609, устойчивых к нитрон-олигомицину и (33S)-

33-дезоксигуанидинтиоцианатоолигомицину и секвенирование их геномов, сравнительный биоинформатический анализ геномов для поиска единичных нуклеотидных замен, транскрипционный и протеомный анализ полученных штаммов, а также проведение стандартных молекулярно-генетических манипуляций, таких как 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, микробиологическая работа с непатогенными бактериями *E. coli* и *S. fradiae* ATCC 19609. Эксперименты по исследованию *in vitro* АТФ-синтазной активности олигомицина А на инвертированных мембранных везикулах и цитотоксичности производных олигомицина А проводились совместно с сотрудниками лаборатории генетики микроорганизмов ИОГен РАН.

Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП Института биохимии им. А.Н.Баха РАН.

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

Полнота изложения материалов диссертации в печатных работах

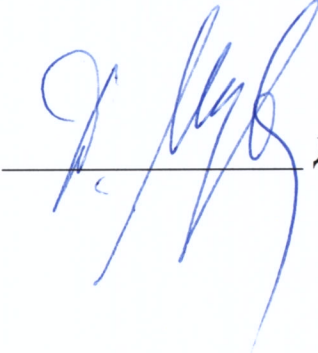
Диссертационная работа состоит из оглавления, введения, пяти глав: обзор литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений, списка цитируемой литературы и благодарностей. Работа изложена на 149 страницах машинописного текста, включает 13 таблиц и 29 рисунков. Список используемой литературы включает 184 публикации.

Основные положения и результаты диссертационного исследования изложены автором в 6 статьях в журналах рекомендованных ВАК, и в 2 статьях в иностранных рецензируемых журналах; помимо этого результаты исследования изложены в тезисах, представленных на различных российских

и международных конференциях. В опубликованных работах полностью изложен материал диссертации.

Диссертация Ватлина Алексея Александровича на тему «Исследование генетических механизмов устойчивости и чувствительности штамма *Streptomyces fradiae* ATCC 19609 к олигомицину А и его производным» является научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований определены новые механизмы возникновения устойчивости к производным олигомицина А (нитрон-олигомицину и (33S)-33-дезоксидезокси-33-тиоцианатоолигомицину), а также выявлена способность низкого уровня ингибирования активности FoF1-АТФ-синтазы олигомицином А. Работа Ватлина А.А. соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация, представленная на соискание ученой степени кандидата наук, и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика. Заключение принято на межлабораторном семинаре Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Присутствовало на заседании 19 чел., в том числе, кандидатов и докторов биологических наук – 11 чел. Результаты голосования: «за» – 19 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол от 27 февраля 2017 г.

Руководитель семинара,
зав. лаб. генетических основ биоразнообразия
ИОГен РАН, д.б.н., проф.


Д.В. Муха