

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента Тренина Алексея Сергеевича на диссертационную работу **Рудаковой Натальи Николаевны**

«Экспрессия генов и структурно-функциональный анализ аминогликозидтрансфераз *Streptomyces rimosus*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

### **Актуальность темы**

В настоящее время одной из наиболее серьезных угроз человечеству является развитие у возбудителей резистентности к применяемым лекарственным препаратам. Особую тревогу вызывает распространение устойчивости к антибиотикам аминогликозидам – одному из наиболее эффективных классов лекарственных средств. Наряду с созданием новых лекарственных препаратов и разработкой новых подходов к лечению инфекционных заболеваний, важнейшим условием в деле борьбы с современными инфекциями является раскрытие природы резистентности, выявление механизмов ее возникновения и развития, изучение природных резервуаров генов устойчивости к антибиотикам.

Работа Рудаковой Натальи Николаевны чрезвычайно актуальна, поскольку посвящена изучению аминогликозидтрансфераз (Aph) *Streptomyces rimosus*, обусловливающих одну из главных причин резистентности микроорганизмов к аминогликозидным антибиотикам. Выявление генов, кодирующих эти ферменты, анализ их экспрессии, как в исходном родительском штамме *S. rimosus*, так и в реципиентном организме *Escherichia coli*, получение рекомбинантных белков и их последующий структурно-функциональный анализ позволяют существенно расширить наше представление об одном из важнейших механизмов резистентности к антибиотикам аминогликозидам. В целом, работа вносит существенный вклад в понимание фундаментальных процессов развития устойчивости к лекарственным препаратам.

**Основные результаты, полученные диссидентом, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна.** При выполнении работы автор с успехом воспользовалась обширным набором современных генетических, микробиологических, биохимических и физико-химических методов. Обоснованно и успешно ею применены современные методы молекулярной

биологии и генной инженерии. Чрезвычайно детальное, ясное и четкое описание этих методов приведено в соответствующем разделе диссертации.

Благодаря применению солидной инструментальной базы, Рудаковой Н.Н. удалось провести весь комплекс разнообразных исследований, необходимых для решения стоящих перед нею задач.

Диссидентом изучен ряд генов *Streptomyces rimosus* ATCC 10970, кодирующих устойчивость к аминогликозидным антибиотикам. Идентифицирован новый ген резистентности к стрептомицину (*aphSR3* (*aph(3")-Id*)), кодирующий стрептомицин фосфотрансферазу. Клонирование этого гена в *E.coli* позволило изучить функциональные особенности кодируемого им фермента, доказать его принадлежность к аминогликозидфосфотрансферазам, обнаружить у него способность к автофосфорилированию *in vitro*, накопить рекомбинантный белок в количествах, достаточных для установления пространственной структуры белка.

Необходимо отметить, что обнаруженная автором способность изучаемой фосфотрансферазы *Aph(3")-Id* к автофосфорилированию была показана для аминогликозид-модифицирующих ферментов бактерий впервые. Это открытие демонстрирует существенную функциональную близость аминогликозидфосфотрансфераз с другим классом ферментов, — протеинкиназами, также способных к автофосфорилированию.

Клонирование в *E. coli* другого фосфотрансферазного гена *S.rimosus* (*aphSR2*), кодирующего устойчивость к аминогликозидным антибиотикам неомицину и гигромицину, проведенное совместно с клонированием генов серин-треониновых протеинкиназ *pkSR1* и *pkSR2*, четко показало влияние одной из них, а именно серин-треониновой протеинкиназы *PkSR1*, на повышение уровня устойчивости к неомицину и гигромицину. Полученные сведения, являющиеся дополнительным свидетельством функциональной близости изучаемых генов, демонстрируют также важную роль серин-треониновых протеинкиназ в развитии устойчивости к аминогликозидам.

При изучении механизмов индукции устойчивости к антибиотикам диссидент показала: стрептомицин и канамицин, внесенные в субингибиторных концентрациях, сами по себе, не влияют на экспрессию генов аминогликозидфосфотрансфераз и не способны вызвать изменения уровня устойчивости *S.rimosus* к аминогликозидам. Вместе с тем, проведение транскрипционного анализа отдельных генов резистома *S. rimosus* ATCC 10970, таких как *aphSR1-14*, *marR*, *tetR*, *lysR*, *whiB*, позволило диссиденту

обнаружить, что внесение стрептомицина вызывает у *S.rimosus* экспрессию гена *tetR*, влияющего на устойчивость к тетрациклину. Последний ген является важным транскрипционным регулятором, принадлежащих к семейству регуляторов индукции протонных помп, обеспечивающих активный транспорт антибиотиков из клетки.

Наконец, с помощью клонирования в клетках *E. coli* гена ацетилтрансферазы *aacSR* автору удалось экспериментально доказать, что устойчивость штамма *S. rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидным антибиотикам (гентамицину, тобрамицину, сизомицину, нетилмицину и изепамицину) может быть обусловлена также геном аминогликозид ацетилтрансферазы, что также можно рассматривать, как несомненно ценное достижение докторанта.

Таким образом, основные научные положения диссертации вполне обоснованы, достоверность и новизна представленных в ней результатов, рекомендаций и выводов не вызывает сомнений.

#### **Научная и практическая значимость.**

Диссертационная работа Рудаковой Н.Н. обладает несомненной научной и практической ценностью. Она вносит существенный вклад в понимание генетических и биохимических механизмов развития резистентности к аминогликозидным антибиотикам, значительно расширяет наши представления об актиномицетах, как о природных резервуарах генов устойчивости к антибиотикам.

Благодаря широкому применению разнообразных генно-инженерных методов, докторанту удалось идентифицировать гены устойчивости *S. rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидам, провести их успешное клонирование в клетках *E.coli* и, добившись выраженной экспрессии этих генов в штаммах-реципиентах, провести детальное изучение структурных и функциональных особенностей кодируемых ими рекомбинантных белков.

Проведенная работа позволила идентифицировать новый ген *aph(3")-Id* устойчивости к стрептомицину, доказать принадлежность кодируемого им белка к фосфотрансферазам и выявить его способность к автофосфорилированию, что для аминогликозид-модифицирующих ферментов бактерий было показано впервые.

Диссертация, существенно расширяет наше представление об аминогликозидфосфотрансферазах, сближает их с таким классом регулирующих ферментов, как серин- треониновые протеинкиназы.

Проведенное автором изучение структурно-функциональных характеристик белков, предоставляет хорошую возможность для выявления новых закономерностей распространения генов резистентности к антибиотикам в микробных популяциях.

Полученные рекомбинантные штаммы, методы выделения ферментов и сами выделенные автором белки могут быть с успехом использованы в дальнейших научных работах, включая создание моделей поиска ингибиторов аминогликозидтрансфераз и, соответственно, разработку новых лекарственных препаратов в области практической медицины.

#### **Степень завершенности работы и качество ее оформления.**

Диссертация написана четким, понятным языком, аккуратно оформлена, ее структура логична и подчинена выбранному автором направлению исследований. Она построена по традиционному принципу: введение, обзор литературы на 40 стр. (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), а также собственно полученные автором результаты и их обсуждение (глава 3), заключение и выводы. Имеется 3 приложения на 15 стр. Общий объем работы, включая приложения, 153 стр. Список цитируемых источников содержит 225 публикаций.

Во введении обосновывается актуальность проблемы, формулируются цели и задачи исследования. Отмечается его научная новизна и практическая ценность.

Обзор литературы состоит из пяти разделов:

В первом разделе анализируются современные сведения о представителях рода *Streptomyces*, как о возможном резервуаре генов лекарственной устойчивости.

Второй раздел посвящен описанию аминогликозидных антибиотиков, включает сведения по истории их открытия и применения, спектру активности, химическому строению, механизму действия.

Третий раздел содержит хорошо структурированную информацию о механизмах устойчивости к аминогликозидным антибиотикам, включая их инактивацию различными ферментами.

Четвертый раздел содержит детальное описание аминогликозидфосфотрансфераз, действие которых, как известно, является одним из основных механизмов устойчивости к аминогликозидным антибиотикам.

В пятом разделе описывается один из ранее открытых ферментов, обуславливающих устойчивость *S. rimosus* ATCC 10970 к аминогликозидам - аминогликозид-3'-фосфотрансфераза AphVIII (код PDB 4H05).

Обзор литературы написан хорошо, весьма информативен, вся приведенная в нем информация напрямую связана с темой диссертации. Обзор успешно выполняет свою задачу, способствуя хорошему восприятию результатов, полученных собственно диссидентом.

Глава 2 (Материалы и методы) отличается доскональностью описания всех использованных в работе методов, способствует четкому восприятию получаемых диссидентом результатов, убеждает в их достоверности.

В главе 3 (Результаты и обсуждение) представлены материалы, полученные собственно диссидентом.

Заключение, отличающееся четкостью и ясностью, закономерно позволяет перейти к выводам.

Полученные диссидентом результаты и выводы опираются на анализ обширного экспериментального материала и существенную методологическую базу. Они вполне обоснованы. Их достоверность не вызывает сомнений.

Очевидно, что проведение всей работы потребовало от диссидентата выполнения чрезвычайно большого объема экспериментальных исследований, связанных с использованием разнообразных генетических, микробиологических, биохимических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов.

Диссертация хорошо написана и оформлена, недостатков немного. Вместе с тем имеется ряд замечаний, касающихся, главным образом, обсуждения результатов проведенных исследований:

- Диссиденту удалось успешно клонировать ряд генов, аннотированных у *S. rimosus* ATCC 10970 в качестве аминогликозидфосфотрансфераз, в том числе *aphSR4*, *aphSR8*, *aphSR12*, *aphSR13* (стр. 103-104). Поскольку при проверке соответствующих рекомбинантных штаммов *E. coli* BL21(DE3) методом стандартных дисков изменений в их устойчивости к аминогликозидным антибиотикам выявить не удалось, автор делает вывод, что указанные гены не обуславливают устойчивости к аминогликозидам, а напротив, выполняют другие функции. По нашему мнению, подобное заключение можно считать несколько преждевременным, поскольку отсутствие выраженной устойчивости к аминогликозидам у штаммов, содержащих перечисленные гены, может

быть следствием их невысокого уровня экспрессии. Указанное замечание относится к трем генам - *aphSR8*, *aphSR12*, *aphSR13*, продукты которых в нативных условиях выявить не удавалось, возможно, именно вследствие их невысокого уровня экспрессии.

- При изучении влияния стрептомицина и канамицина на изменение чувствительности к антибиотикам автору удалось достоверно показать повышение чувствительности *S. rimosus* ATCC 10970 к макролидному антибиотику эритромицину (Табл.21, стр.105). Указанное наблюдение представляется чрезвычайно интересным и нуждается, на наш взгляд, в несколько более детальном анализе.
- Имеются отдельные стилистические неточности и опечатки. Например, неудачное выражение на стр.7 во введении, в котором сказано, что аминогликозидфосфотрансферазы (Aph) «...впервые были обнаружены на плазмидах и мобильных элементах...», хотя очевидно, что автор, скорее всего, имеет в виду расположенные на плазмидах гены.

На наш взгляд, требует также уточнения цифра, приведенная в самом начале диссертации относительно числа людей, ежегодно умирающих от инфекций, вызванных возбудителями, устойчивыми к антибиотикам. Указанная на стр.4 цифра в 23 000 человек ежегодно представляется несколько заниженной.

Высказанные замечания ни в коем случае не снижают общей высокой оценки работы. Диссертация написана грамотно, хорошим языком, отлично иллюстрирована. В целом, диссертация Рудаковой Н.Н. является новым вкладом в изучение генетических и биохимических аспектов устойчивости к аминогликозидным антибиотикам.

Все эксперименты проведены соискателем на высоком методическом уровне, полученные результаты достоверны, основные выводы убедительны. По теме диссертационной работы опубликованы 5 статей в рецензируемых журналах, входящих в Перечень научных изданий, рекомендованных ВАК РФ. В статьях и в автореферате отражено основное содержание диссертации.

### **Заключение.**

Диссертационная работа Рудаковой Н.Н. «Экспрессия генов и структурно-функциональный анализ аминогликозидтрансфераз *Streptomyces rimosus*» представляет собой законченное научное исследование, которое вносит существенный вклад в изучение фундаментальных закономерностей в области генетических и биохимических механизмов резистентности к антимикробным препаратам. Выполненное исследование имеет также

несомненную практическую ценность, поскольку открывает новые перспективы в исследованиях в области клонирования генов устойчивости к антибиотикам, а также в создании модельных систем, необходимых для разработки новых антимикробных лекарственных средств.

По своему содержанию и объему проведенных исследований представленная работа полностью соответствует требованиям ВАК, в том числе пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановления № 335 от 21 апреля 2016 г), а её автор Рудакова Наталья Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

28 ноября 2019 г.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией Разработки методов поиска биологически активных соединений ФГБНУ “НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе”

доктор биологических наук

  
А.С. ТРЕНИН

Отзыв официального оппонента А.С. Тренина заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ “НИИ по изысканию

новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе”

кандидат химических наук

  
О.В. Кисиль

Адрес организации: 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 11, стр. 1  
тел. 89060339851, e-mail: [as-trenin@mail.ru](mailto:as-trenin@mail.ru)