

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д.002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ ПРЕДСТАВЛЕННОЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от «27» февраля 2020 г. протокол №3  
о присуждении Трутневой Ксении Александровне, имеющей гражданство  
Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Трутневой Ксении Александровны «Особенности белкового состава и факторы поддержания жизнеспособности покоящихся форм микобактерий» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, принята к защите 21 ноября 2019 года (протокол № 26) диссертационным советом Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ №2249-1602 от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. №74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015 г. №1166/нк.

### **Соискатель**

В 2013 году Трутнева К.А. окончила кафедру биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского» с присуждением квалификации «Биолог». С 2013 по 2017 год обучалась в очной аспирантуре Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы

биотехнологии» РАН. С 2017 году по настоящее время работает на должности младшего научного сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Диссертация выполнена в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

### **Научный руководитель**

Капрельянц Арсений Сумбатович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

### **Официальные оппоненты**

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лаборатории бионанотехнологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Ткаченко Александр Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермский Федеральный Исследовательский Центр Уральского отделения Российской Академии Наук филиал «Института Экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской Академии Наук

Выбор оппонентов был обусловлен:

- тем, что доктор биологических наук Игнатов Сергей Георгиевич известен как крупный специалист в области физиологии патогенных бактерий в том числе возбудителя туберкулеза, а также в разработке антибактериальных препаратов, в частности против туберкулеза;

- тем, что доктор медицинских наук Ткаченко Александр Георгиевич является ведущим отечественным специалистом в области молекулярных механизмов стрессового ответа у бактерий, в частности микобактерий.

Высокая квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Трутневой К.А.

### **Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своем положительном отзыве, составленном руководителем лаборатории трансляционной биомедицины НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Ткачуком Артемом Петровичем, и утвержденном на совместном семинаре лаборатории, указала, что диссертационная работа Трутневой К.А. является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует критериям, изложенным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным правительством РФ 24.09.2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи является признанным отечественным центром исследований молекулярной и медицинской микробиологии и инфекционной иммунологии, в котором лаборатория трансляционной медицины активно проводит изучение молекулярных механизмов лежащих в основе явления латентности и персистенции туберкулеза, и располагает значительным опытом исследований иммунного ответа человека при туберкулезной инфекции. Таким образом сотрудники указанной лаборатории являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования в тематике, непосредственно связанной с диссертационной работой Трутневой К.А.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

## Публикации

Основные материалы диссертации Трутневой К.А. опубликованы в 5 статьях, докладывались и обсуждались на российских и зарубежных конференциях. По итогам было опубликовано 5 статей и 8 тезисов конференций.

1. Trutneva K., Shleeva M., Nikitushkin V., Demina G., Kaprelyants A. Protein composition of *Mycobacterium smegmatis* differs significantly between active cells and dormant cells with ovoid morphology. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9:2083.
2. Shleeva M. Trutneva K., Demina G., Zinin A., Sorokoumova G., Laptinskaya P., Shumkova E., Kaprelyants A. Free trehalose accumulation in dormant *Mycobacterium smegmatis* cells and its breakdown in early resuscitation phase. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8: 524.
3. Nikitushkin V., Shleeva M., Zinin A., Trutneva K., Ostrovsky D., Kaprelyants A. The main pigment of the dormant *Mycobacterium smegmatis* is porphyrin. *FEMS Microbiology Letters*. 2016, 363(19) pii: fnw206.
4. Никитушкин В.Д. Зинин А.И. Капрельянц А.С. Островский Д.Н. Трутнева К.А. Шлеева М.О. Пигмент покоящихся микобактерий определен как порфирин. *Межрегиональный сборник научных работ, Воронеж 2014*. вып. 16, стр. 4-9.
5. Островский Д.Н., Никитушкин В.Д., Трутнева К.А., Зинин А.И., Шлеева М.О., Капрельянц А.С. Избирательная экстракция липидов с поверхности бактерий с целью локализации структурных перемен при переходе их в состояние покоя. *Межрегиональный сборник научных работ, Воронеж, 2016*, вып. 18, стр. 4-12.

### На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук Игнатова Сергея Георгиевича (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

1. В разделе «Методы исследования» есть вставка с другими параметрами шрифтов.
2. В разделе сокращений отсутствует расшифровка ЦТК, АФК и СРМ (рис. 3 автореферата).
3. В табл. 1 автореферата отсутствует продольное деление, поэтому трудно ее анализировать
4. В подразделе «научная новизна», во втором пункте прошу объяснить термин для белков «потенциально энзиматически активны»

5. Покоящиеся клетки *M. smegmatis* сходны с дрожжевыми и грибными спорами. А в сравнении с бактериальными спорами?
6. Образуют ли биопленки покоящиеся клетки?

Отзыв официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Ткаченко Александра Георгиевича (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

1. По какому метаболическому пути синтезировалась глюкоза, как предшественник трегалозы, покоящимися клетками Msm в условиях модифицированной среды Сотона, содержащей глицерин, цитрат и аспарагин? Обнаружена ли активность фосфоенолпируват-карбоксикиназы в этих условиях?

2. Чем можно объяснить, что при отсутствии активности изоцитратлиазы в покоящихся клетках обнаружена активность второго ключевого фермента глиоксилатного пути, малатсинтазы, для которой субстратом является продукт первой - глиоксилат?

3. В представленной работе цАМФ рассматривается как фактор, ответственный за поддержание высокой колониеобразующей активности микобактерий, а его снижение в покоящихся клетках приводит к формированию состояния некультивируемости (Табл. 1, Табл. 2). Как это соотносится с данными Nosho et al. (2018) о том, что в бактериальных клетках, в частности *E. coli*, цАМФ, наоборот, участвует в формировании состояния некультивируемости в стрессовых ситуациях, отрицательно регулируя колониеобразующую активность?

4. Какие функции выполняют белки, обладающие «крайне высокой стабильностью» в покоящихся клетках D2, чем определяется их стабильность и существуют ли данные о скоростях деградации и возможности ресинтеза таких белков?

5. Как изменяется содержание Rel белка в клетках микобактерий при длительном поддержании состояния покоя и изменяется ли его функциональная активность в этих условиях?

6. В качестве незначительного замечания по оформлению работы следует указать, что в списке использованной литературы ссылки (№№ 106, 283) на статьи, опубликованные в отечественном журнале «Микробиология», приведены в англоязычной транскрипции.

Отзыв ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

1. В приложениях 1 и 2 диссертационной работы приведены значения «Score» для идентифицированных белков микобактерий, однако в материалах и методах не указано, при каких значениях скоров идентификация белков считалась надежной/возможной. Кроме того, заглавия таблицы приведены на английском языке, стоило их перевести на русский.

2. Согласно приведенным в приложениях 1 и 2 данным, многие белки были идентифицированы сразу в нескольких белковых образцах (пятнах). При этом, в зависимости от изучаемого состояния клеток количество, а также представленность конкретного белкового пятна может сильно варьировать. Автор не обсуждает в диссертации возможные причины этого явления. В то же время, такие результаты могут быть связаны как с методическими особенностями пробоподготовки (модификации белков при их экстракции или в процессе проведения 2DE), так и с особенностями самих белков (посттрансляционные модификации, изоформы). Для отдельных, наиболее интересных образцов в данном случае целесообразно было бы провести MS/MS идентификацию, такой сравнительный анализ может быть интересным и информативным для понимания процессов, происходящих в клетках.

3. Интересно, что автор использует в исследовании сразу два вида микобактерий, отличающихся между собой скоростью роста и патогенностью для человека. К сожалению, несмотря на то, что белковые профили были получены для обоих видов, многие биохимические параметры (энзиматическая активность и тд.) изучены только на примере *M. smegmatis*. В то же время, автор показывает, что в состояние истинного покоя переходил только *M. tuberculosis*. В связи с этим, аппроксимацию полученных данных по изменению метаболизма у микобактерий стоит делать с очень большой осторожностью. Кроме того, в рамках работы было бы интересно провести сравнение белковых профилей *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* между собой. В том числе, это позволило бы более полно охарактеризовать разработанную модель.

#### **На автореферат поступили положительные отзывы от:**

Владимирского М.А., доктора медицинских наук, профессора, заведующего лабораторией иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции Национального медицинского исследовательского Центра фтизиопульмонологии и инфекционных болезней Минздрава России, замечаний нет.

Логинова Д.Д. , кандидата биологических наук, научного сотрудника лаборатории гликобиохимии Университета Южной Богемии, Чески-будеёвиц, Чехия. В отзыве имеется следующее замечание:

«Основным замечанием к работе является выбор метода протеомного анализа. В настоящее время двумерный электрофорез с последующим MALDI MS анализом редко применяется в подобных исследованиях. Использование «shotgun proteomics» позволило бы значительно сократить время пробоподготовки, увеличить количество идентифицированных белков и получить количественные данные»

Гулий О.И. проф., доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений и микроорганизмов Российской Академии Наук, замечаний нет.

Башировой Н.Ф. , кандидата биологических наук, доцента Брянского университета им. акад. И.Г. Петровского, замечаний нет.

Аленькиной С.А., кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений и микроорганизмов Российской Академии Наук, замечаний нет.

Рууге Э.К. проф., доктора физико-математических наук, главного научного сотрудника НИИ Экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, замечаний нет.

Кондратьевой Т.К., доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории иммуногенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Центральный научно-исследовательского института туберкулеза, замечаний нет

Ажикиной Т.Л., доктора биологических наук, руководителя лаборатории регулярной транскриптомики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В отзыве имеется следующее замечание:

«В автореферате отсутствуют детали того, как по данным двумерного электрофореза определяли представленность отдельных белков»

## **В дискуссии принимали участие:**

д.б.н. проф. Звягильская Р.А., д.б.н. Топунов А.Ф., д.б.н. Шумаев К.Б., д.б.н. Мулюкин А.Л., д.б.н. проф. Марданов А.В., д.б.н. член-кор. Гуснев Н.Б., д.б.н. проф. Левицкий Д.И., д.х.н. Дзантиев Б.Б., д.б.г. Шумянцева В.В.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены основные результаты:

- Покоящиеся клетки микобактерий сохраняют значительное разнообразие белков несмотря на длительное пребывание в состоянии покоя.
- Среди сохранившихся в покоящихся клетках белков присутствуют ферменты-участвующие в центральных метаболических путях, процессах транскрипции и трансляции. Последние, очевидно, неактивны в состоянии покоя, и необходимы в процессах последующей реактивации.
- В покоящихся клетках микобактерий снижается представленность белков, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот, а также транспортных и биосинтетических процессах.
- В покоящихся клетках микобактерий, по сравнению с активными клетками, увеличивается представленность белков, участвующих в защите от окислительного стресса, а также от агрегации и денатурации белков.
- В покоящихся клетках микобактерий увеличивается представленность белков, участвующих в синтезе порфиринов и трегалозы, которые являются низкомолекулярными факторами, принимающими участие в защите и стабилизации бактериальной клетки в состоянии покоя.
- Накопление трегалозы в покоящихся микобактериях и ее распад под действием трегалазы в первые часы реактивации впервые позволяет сделать вывод о сходстве между истинными спорами грибов и покоящимися клетками микобактерий.

## **Теоретическая значимость диссертации заключается в том, что**

В диссертационной работе Трутневой К.А. впервые были исследованы с помощью протеомных методов покоящиеся клетки микобактерий (*M. smegmatis* и *M. tuberculosis*), обладающие сниженной метаболической активностью после длительного периода хранения (до 1 месяца для *M. smegmatis* и до 1 года для *M. tuberculosis*).

Обнаружено, что покоящиеся формы микобактерий после длительного хранения сохраняют значительное разнообразие белков, многие из которых не выявляются в протеоме активных клеток. Экспериментально подтверждено, что белки, обнаруженные в протеоме покоящихся клеток потенциально энзиматически активны. Предполагается, что обнаруженные в покоящихся клетках белки, являются «запасенными» для дальнейшей реактивации клеток а также могут быть функциональными и играть роль в поддержании клеточного метаболизма на уровне достаточном для выживания.

Среди обнаруженных белков в значительной степени представлены белки, участвующие в защите клетки от воздействия стрессовых факторов.

Выявлено накопление стрессового метаболита - свободной трегалозы, в значительных количествах в покоящихся клетках *M. smegmatis*, что делает их сходными с дрожжевыми и грибными спорами. В работе установлена связь уровня трегалозы и выживаемости покоящихся клеток, а также ее важная роль в реактивации микобактерий.

Определена природа накапливаемого и секретируемого покоящиеся клетками *M. smegmatis* в значительных количествах вещества как пигмент класса порфиринов.

#### **Практическая значимость работы в том, что:**

Обнаруженные в ходе работы процессы, происходящие в покоящихся клетках микобактерий, важны для понимания явления латентности и реактивации латентного туберкулеза. Белки, обнаруженные в ходе протеомного анализа покоящихся клеток *M. tuberculosis*, являются потенциальными мишенями для создания антитуберкулезных препаратов и могут быть использованы для диагностики латентного туберкулеза.

#### **Конкретное личное участие автора в получении результатов.**

Личный вклад диссертанта заключался в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке научных публикаций.

#### **Заключение**

считать диссертационную работу Трутневой К.А. законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует критериям, изложенным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденным правительством РФ 24.09.2013 г. №842, и профилю диссертационного совета Д.002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр

