

Отзыв официального оппонента

на диссертацию Мартины Билли Александровны

«Малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия «патоген-хозяин», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы исследования

Последние десятилетия отмечены высоким уровнем заболеваемости туберкулёзом, что является серьезной мировой проблемой. Возбудитель туберкулеза, бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, является патогеном, способным к длительному пребыванию в организме человека. *M. tuberculosis* способен переходить в состояние покоя, сопровождающееся отсутствием деления и роста, однако даже в таком состоянии в клетках патогена сохраняется минимальная метаболическая активность. Одними из эффективных регуляторов экспрессии генов, способствующих успешной адаптации *M. tuberculosis* к действию неблагоприятных факторов со стороны иммунной системы хозяина, являются малые некодирующие РНК, чем обеспечивают быстрое изменение протекающих в клетке метаболических процессов, и позволяют возбудителю приспособливаться к меняющимся условиям внешней среды. Изучение функции малых РНК *M. tuberculosis* во взаимодействии патогена и инфицированного хозяина является интересной задачей современной биохимии, позволяющей найти новые подходы к терапии туберкулёза. Таким образом, тема диссертационной работы Мартины Билли Александровны «Малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия «патоген-хозяин»» является актуальной и имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов

В ходе работы Мартины Б.А. впервые получены штаммы *M. tuberculosis* с делециями генов малых некодирующих РНК Δ DrrS, Δ Mcr11 и штамм с двойной делецией $\Delta\Delta$ DrrS_Mcr11. Впервые изучены транскриптомы полученных мутантных штаммов и штаммов с гиперэкспрессией DrrS и Mcr11. Автору удалось обнаружить, что малые РНК Mcr11 и DrrS регулируют уровень экспрессии генов, кодирующих факторы вирулентности и белки стрессового ответа *M. tuberculosis*. Автор показал, что малые РНК

DttS и Mcr11 играют роль в формировании иммунного ответа инфицированного макроорганизма, что было установлено при изучении транскриптома костномозговых макрофагов мышей при инфекции их мутантными штаммами *M. tuberculosis* Δ DttS, Δ Mcr11 и $\Delta\Delta$ DttS_Mcr11. Инфекция мышей штаммом Δ DttS приводит к увеличению продолжительности жизни инфицированных животных, что говорит об ослаблении вирулентных свойств *M. tuberculosis*, а штаммами Δ Mcr11 и $\Delta\Delta$ DttS_Mcr11 – к сокращению продолжительности их жизни. Таким образом, установлено, что малые РНК DttS и Mcr11 могут оказывать значительное влияние на успешную адаптацию *M. tuberculosis* и сохранение жизнеспособности патогена при инфекции, и влиять на развитие инфекции у организма-хозяина. Полученные в ходе работы новые штаммы Δ DttS, Δ Mcr11 и $\Delta\Delta$ DttS_Mcr11 *M. tuberculosis*, обладающие различными вирулентными свойствами, могут быть использованы для дальнейшего изучения патогена как в моделях *in vitro*, так и *in vivo*, что чрезвычайно важно для понимания новых подходов к лечению туберкулезной инфекции.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Мартини Б.А. состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в работе, а также результатов собственных исследований и их обсуждения, и содержит заключение, выводы и список цитируемой литературы, который включает 257 источников. Работа изложена на 185 страницах, в конце работы приведены приложения, в которых представлены результаты транскриптомных исследований. Работа хорошо структурирована, разделы и подразделы логически связаны друг с другом. В работе диссертантом поставлены 5 основных задач, по которым сформулированы 6 положений, выносимых на защиту, полностью отражающих поставленные задачи. По результатам диссертационной работы также сформулированы 6 выводов, которые соответствуют цели и задачам исследования, подтверждаются его результатами и являются научно обоснованными и практически значимыми. Диссертация представляет собой законченную работу, автореферат диссертационной работы и опубликованные автором научные труды в достаточной мере отражают содержание диссертации. По теме диссертации автором опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах.

В главе «Введение» автором отмечена актуальность темы исследования, сформулирована цель и задачи, описана научная новизна, теоретическое и практическое значение работы, и приведен список положений, выносимых на защиту. Указаны

сведения об апробации работы Мартини Б.А. на научных конференциях и опубликованных печатных работах.

Глава «Обзор литературы» посвящена описанию *M. tuberculosis*, приведена его общая характеристика и описаны особенности состава клеточной стенки. Автором описан патогенез туберкулёзной инфекции человека и факторы вирулентности *M. tuberculosis* с указанием особенностей взаимодействия возбудителя с клетками иммунной системы человека. Также приводится описание некодирующих РНК *M. tuberculosis* и их регуляторной роли в бактериальной клетке. Рассмотрены подходы к обнаружению малых РНК у микобактерий и поиск их мишеней. Приведена подробная информация об участии малых РНК DrrS и Mcr11 в развитии туберкулёзной инфекции, полученная в работах, предшествующих данному исследованию.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание методов получения мутантных штаммов *M. tuberculosis* по малым РНК DrrS и Mcr11, изучения транскриптомов, инфицирования полученными штаммами макрофагов и мышей. Приведенные описания методов работы достаточно подробны и позволяют воспроизвести результаты, приведенные в главе «Результаты и обсуждение».

Глава «Результаты и обсуждение» посвящена собственным экспериментальным результатам, полученным Мартини Б.А. в ходе работы. Первая часть содержит описание экспериментов со штаммами *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующими малые РНК DrrS и Mcr11, которые заключались в оценке устойчивости бактерий к различным видам стрессового воздействия. Вторая часть посвящена описанию процесса создания штаммов с делециями генов малых РНК DrrS и Mcr11 в *M. tuberculosis*; в третьей части содержатся результаты сравнения свойств полученных мутантных штаммов со штаммом дикого типа в стандартных условиях роста, в условиях стрессового воздействия, в модели покоящегося состояния и при инфекции макрофагов. Четвертая часть главы посвящена анализу свойств мутантных штаммов были проанализированы после восстановления их вирулентного потенциала путем пассирования их через организм животного.

Основные результаты, полученные в ходе работы

1. Впервые получены штаммы *M. tuberculosis* с делециями генов малых РНК DrrS и Mcr11, проведена их характеристика в моделях *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*
2. Установлено, что малая РНК DrrS играет важную роль в формировании устойчивости *M. tuberculosis* к внешнему стрессовому воздействию (недостаток питательных веществ, низкие значения pH среды, действие активных форм кислорода и

азота), сходному со стрессовым воздействием, оказываемым на микобактерии при фагоцитировании их макрофагами. DtgS способствует лучшей выживаемости выживаемости микобактерий под действием неблагоприятных внешних факторов.

3. По данным транскриптомного анализа штаммов с делецией и гиперэкспрессией DtgS и Mcr11 методом RNA-seq обнаружено, что эти малые РНК влияют на уровень экспрессии генов патогенности бактерии и факторов вирулентности, а также генов, кодирующих белки стрессового ответа.

4. Показано, что малая РНК DtgS регулирует экспрессию генов, кодирующих НАДН-дегидрогеназу, АТФ-синтазу и гены Dos-регулона, играющего основную роль в персистенции *M. tuberculosis* при инфекции.

5. Установлено, что инфекция костномозговых макрофагов мыши мутантными штаммами с делецией генов DtgS и Mcr11 (по отдельности или оба) приводит к существенному изменению транскриптомного ответа макрофагов на инфекцию *M. tuberculosis* по сравнению с инфекцией штамма дикого типа.

6. Обнаружено, что при инфекции мышей делеция гена DtgS приводила к увеличению продолжительности жизни животных, то есть к ослаблению вирулентности штамма, а делеция гена Mcr11, а также обоих генов малых РНК приводила к усилению вирулентности штамма и уменьшению времени жизни животных.

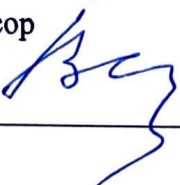
Все экспериментальные результаты, полученные Мартини Б.А. в ходе диссертационной работы получены с применением современных методов исследования. Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из полученных результатов, и полностью обоснованы.

Заключение

Диссертационная работа Мартини Билли Александровны «Малые некодирующие РНК DtgS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия «патоген-хозяин», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия по своему содержанию, актуальности выбранной темы, уровню проведенных исследований, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от

24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Мартини Б.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

заведующий лабораторией иммунопатологии и иммунодиагностики туберкулезной инфекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук по специальности 14.03.07. Химиотерапия и антибиотики, 14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология, профессор


Владимирский М.А.

Адрес:
127473, г. Москва, ул. Достоевского, 4,
телефон: 8 (495)681-74-32
электронная почта: mvladimirskij@mail.ru

Подпись д.м.н., проф. Владимирского М.А. заверяю
Заместитель директора по научной работе «НМИЦ ФТИ» Минздрава России
Доктор медицинских наук




Самойлова А.Г.

«12» октября 2023 г.