

Федеральное бюджетное
учреждение науки
«Санкт-Петербургский
научно-исследовательский
институт эпидемиологии
и микробиологии
им. Пастера
Федеральной службы по
надзору в сфере защиты
прав потребителей и
благополучия человека»
ул. Мира., д. 14,
Санкт-Петербург, 197101
Телефон: (812) 233-20-92
Факс: (812) 233-20-92
E-mail: pasteur@pasteurorg.ru
htt://pasteurorg.ru
ОКПО 01967164
ОГРН 1037828006314
ИНН/КПП
7813047047 / 781301001
№ _____ от _____ 20__ г.
1125/1-13 11.09.2023г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Санкт-
Петербургский научно-
исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им.
Пастера» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



академик РАН

Тотолян А.А.

«11» сентября 2023 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Мартини Билли Александровны «Малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия “патоген-хозяин”» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы исследования

Высокий уровень заболеваемости туберкулёзом является серьезной проблемой как в России, так и в мире; по данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно регистрируется около 10 млн новых случаев заболевания туберкулёзом. Возбудитель инфекции *Mycobacterium tuberculosis* является древним патогеном человека, высоко адаптированным к пребыванию в организме хозяина. Фундаментальное изучение молекулярно-генетических механизмов адаптации *M. tuberculosis* к внутриклеточной среде пребывания в организме должно привести к лучшему пониманию возможных способов лечения и профилактики туберкулёза. Важной чертой возбудителя является способность переходить в покоящееся состояние и длительно сохранять свою жизнеспособность, несмотря на отсутствие активного роста и деления. В покоящемся состоянии, как и при активной инфекции в мышинных моделях, микобактерии синтезируют в большом количестве некодирующие регуляторные РНК Mcr11 и DrrS. Малые РНК контролируют экспрессию генов, чем обеспечивают быстрое изменение протекающих в клетке метаболических процессов, и позволяют возбудителю приспосабливаться к меняющимся условиям внешней среды. Изучение функции малых РНК Mcr11 и DrrS *M. tuberculosis* во взаимодействии патогена и хозяина является интересной и актуальной задачей,

позволяющей найти новые подходы в терапии туберкулёза. Таким образом, тема 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.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, содержит заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 257 литературных источников. Работа изложена на 185 страницах, в конце диссертации приводятся результаты транскриптомного анализа полученных в ходе работы мутантных штаммов *M. tuberculosis* с делециями генов малых РНК DrrS и Mcr11, а также транскриптомные профили макрофагов, заражённых этими мутантными штаммами.

Изложение литературных данных и результатов исследований хорошо структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследований и логически связаны друг с другом.

В работе поставлены 5 основных задач, по которым сформулированы 6 положений, выносимых на защиту, полностью отражающих эти задачи.

По результатам диссертационной работы сформулированы 6 выводов, которые полностью правомерны, 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.

Содержание диссертации

Во введении автор отмечает актуальность темы исследования и степень ее разработанности, формулирует цель, задачи, описывает научную новизну, теоретическое и практическое значение, и приводит список положений, выносимых на защиту. Приводятся сведения об апробации работы на научных конференциях и печатных работах, опубликованных по теме диссертации.

Глава «Обзор литературы» начинается с описания возбудителя инфекции *M. tuberculosis*. Приведена общая характеристика патогена и перечислены основные отличия патогенных и непатогенных видов рода *Mycobacterium*, и биохимические особенности

состава клеточной стенки микобактерий. Следующая часть литературного обзора посвящена описанию бактериальных некодирующих РНК и их роли в регуляции метаболических процессов в клетке. Дана краткая история открытия и развития представлений о роли некодирующих РНК бактерий, классификация некодирующих РНК и механизм действия подгруппы малых РНК. Следующая часть литературного обзора посвящена малым РНК *M. tuberculosis*. Рассмотрены подходы к обнаружению малых РНК у микобактерий и поиск их мишеней. Также описано обнаружение и изучение малых РНК DrrS и Mcr11, предшествовавшее данной работе.

Глава «Материалы и методы» содержит полное описание арсенала методов, использованных для создания мутантных штаммов *M. tuberculosis* с делециями генов малых РНК, комплементацией делеций, а также штаммов с гиперэкспрессией малых РНК, изучения фенотипических свойств этих штаммов, получения транскриптома, инфицирования полученными штаммами макрофагов и лабораторных животных. Приведенные описания методов работы изложены достаточно подробно для воспроизведения результатов, приведенных в главе «Результаты и обсуждение».

Глава «Результаты и обсуждение» посвящена собственным результатам, полученным Мартини Б.А., и разделена на 4 части. Первая часть содержит описание экспериментов со штаммами *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующими малые РНК DrrS и Mcr11. Была проведена оценка устойчивости и транскрипционной активности клеток к различным видам стресса *in vitro*, а также в модели заражения культуры макрофагов *ex vivo*, показано повышение устойчивости штамма с гиперэкспрессией DrrS *M. tuberculosis* к неблагоприятным внешним факторам. Проведён транскриптомный анализ штаммов с гиперэкспрессией DrrS и Mcr11, и последующий анализ генов с дифференциальной экспрессией в этих штаммах.

Вторая часть посвящена получению штаммов с делециями генов малых РНК DrrS и Mcr11 в *M. tuberculosis*. Подробно описана схема получения конструкции для делеции, приведены все стадии и промежуточные результаты получения делеций, подтверждение успешного получения трёх новых штаммов *M. tuberculosis*: с делецией гена малой РНК DrrS, с делецией гена малой РНК Mcr11, и с делецией генов обеих малых РНК.

Третья часть содержит результаты изучения полученных мутантных штаммов с делециями генов малых РНК в условиях *in vitro*. Приводятся сравнения свойств мутантных штаммов со штаммом дикого типа в стандартных условиях роста, в модели покоящегося состояния и при инфекции макрофагов. Хотя фенотипически штаммы не отличаются от материнского контрольного штамма, они имеют значительные транскриптомные отличия, выявленные при изучении тотальной РНК методом RNA-seq. Приводится описание

транскриптомных профилей штаммов в двух фазах роста – логарифмической и стационарной. На основании анализа профиля транскрипции мутантных штаммов с делецией и гиперэкспрессией Mcr11 и DrrS сделано предположение о возможных метаболических изменениях в изучаемых штаммах. Показано, что малая РНК DrrS регулирует экспрессию генов, кодирующих НАДН-дегидрогеназу, АТФ-синтазу и гены Dos-регулона, играющего основную роль в персистировании *M. tuberculosis* при инфекции, предложена гипотетическая схема угнетения аэробного дыхания в штамме с делецией гена малой РНК DrrS.

Четвертая часть главы «Результаты и обсуждение» раскрывает связь малых РНК с патогенностью *M. tuberculosis*. Полученные мутантные штаммы были проанализированы после восстановления их вирулентного потенциала. Показано, как после инфекции макроорганизма изменяются свойства штаммов в лабораторных условиях. Предложена и подтверждена *in vitro* мишень малой РНК DrrS – ген Rv3679. Проведен опыт по заражению первичных костномозговых макрофагов мыши с анализом ответа макрофагов на заражение и установлено, что отсутствие генов малых РНК, в особенности отсутствие обоих генов сразу, существенно меняет реакцию макрофагов на инфекцию *M. tuberculosis*. Также приведены результаты модельной туберкулёзной инфекции мышей мутантными штаммами *M. tuberculosis*. Обнаружено, что делеция гена DrrS приводила к ослаблению вирулентности штамма, а делеция гена Mcr11, а также обоих генов малых РНК приводила к усилению вирулентности штамма и ускоренной гибели животных. Таким образом, показано фактическое участие малых РНК DrrS и Mcr11 во взаимодействии с макроорганизмом.

Все экспериментальные результаты диссертационной работы получены с применением современных надежных и эффективных экспериментальных методов. Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенных исследований и являются в полной мере обоснованными. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых международных и российских журналах.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

Мартини Б.А. впервые методом гомологичной рекомбинации получены штаммы *M. tuberculosis* с немаркированными делециями генов малых РНК DrrS и Mcr11. Получены и проанализированы транскриптомы мутантных штаммов *M. tuberculosis* с гиперэкспрессией и делецией малых РНК DrrS и Mcr11; обнаружено, что малые РНК Mcr11 и DrrS регулируют уровень экспрессии генов, определяющих патогенность бактерии и кодирующих факторы вирулентности и белки стрессового ответа. Впервые показано, что малая РНК DrrS повышает устойчивость микобактерий к стрессовому воздействию, а также впервые

предложена мишень для малой РНК DrrS. Впервые показано, что малые РНК DrrS и Mcr11 играют роль в формировании иммунных реакций макроорганизма, что было установлено при изучении транскриптомного ответа костномозговых макрофагов мышей на заражение мутантными штаммами *M. tuberculosis* с делецией генов малых РНК. Установлено, что малые РНК DrrS и Mcr11 вовлечены в процессы биохимической регуляции взаимодействия патогена *M. tuberculosis* и макроорганизма при инфекции, и могут оказывать значительное влияние как на успешную адаптацию патогена и сохранение его жизнеспособности при инфекции, так и определять характер течения инфекции для организма-хозяина, модулируя его иммунный ответ.

Практическая значимость работы

В ходе работы получены новые штаммы *M. tuberculosis*, обладающие разным вирулентным потенциалом и которые могут быть использованы в изучении свойств патогенных микобактерий *ex vivo* и *in vivo*. Штамм с делецией малой РНК DrrS, характеризующийся сниженной вирулентностью, может служить основой для создания вакцинного штамма *M. tuberculosis*. Установлены метаболические пути *M. tuberculosis*, в регуляции которых принимают участие малые РНК Mcr11 и DrrS. Полученные результаты имеют фундаментальное значение для понимания механизмов взаимодействия *M. tuberculosis* с организмом хозяина и способности бактерий к длительному выживанию в стрессовых условиях. Уровень экспрессии малых РНК Mcr11 и DrrS также может являться диагностическим маркером форм туберкулёза, связанных с длительным персистированием микобактерий в организме, что может быть использовано на практике для разработки новых терапевтических подходов в борьбе с туберкулезом.

Апробация диссертации

Основные научные результаты диссертационной работы Мартины Билли Александровны «Малые не кодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия “патоген-хозяин”» были представлены на международных и российских конференциях: VII Съезд биохимиков России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, 2022 год); EMBO Workshop on Tuberculosis 2022 «From innovation to intervention» (Париж, 2022 год), XXXIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, (Москва, 2021 год); Всероссийская научно-практическая конференция с международным

участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020» (Москва, 2020 год); II Объединённый научный форум и VI съезд биохимиков России (Дагомыс, 2019 год).

Замечания по работе

Диссертация написана хорошим литературным языком и практически не содержит опечаток, однако к ней могут быть высказаны следующие замечания:

1. *M. tuberculosis* – гетерогенный биологический вид включающий по крайней мере 10 филогенетических линий, 4 из которых значимы для человека, с сильными различиями путей эволюции и ко-адаптации с *Homo sapiens*. Находки для одних генотипов желательно проверять на других генотипах. Для получения мутантов автор использовала штамм H37Rv – классический и наиболее изученный референтный штамм, что в целом логично. Изначально штамм H37Rv был выделен в начале XX века от больного в Нью-Йорке, и сейчас в мире существует несколько вариантов этого штамма с некоторыми различиями в геноме. Нужно понимать, что H37Rv далеко не идеальный референс-штамм, он представляет сублинию L4.9 (в рамках Евро-Американской филогенетической линии) которая была распространена 100 лет назад, но сейчас она достаточно маргинальная (в плане своего распространения) и в будущем было бы интересно повторение данной работы на штаммах актуальных эпидемических генотипов, прежде всего относящихся к генотипам Beijing, LAM (Latin-American Mediterranean) и Ural.

2. Автор пишет, что «геномы мутантных штаммов депонированы в базе данных NCBI SRA и могут быть найдены по номеру: ID PRJNA701202». Возникает вопрос, депонированы ли также данные по транскриптомике в открытых базах данных?

3. В разделе 2.6 главы «Материалы и методы» не приведены последовательности праймеров, использованных для создания конструкции для комплементации делеции генов малых РНК.

Сделанные замечания не затрагивают основного содержания рассматриваемой диссертации и не влияют на общую высокую оценку научного уровня и выполненной диссертантом работы.


Заключение

Диссертация Мартини Б. А. «Малые некодирующие РНК DttS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия “патоген-хозяин”» является работой,

в которой, на основании выполненных автором исследований, обосновано участие малых РНК DrrS и Mcr11 *M. tuberculosis* в проявлении вирулентных свойств патогена и взаимодействии с организмом хозяина, описано влияние этих малых РНК на транскриптом бактерий, а также предложена мишень для малой РНК DrrS – ген Rv3679.

Таким образом, диссертационная работа Мартини Билли Александровны «Малые некодирующие РНК DrrS и Mcr11 *Mycobacterium tuberculosis* – факторы взаимодействия “патоген-хозяин”», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является завершенной научно-квалификационной работой, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством РФ (Постановление № 842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям и заслуживает высокой оценки, а автор диссертации Мартини Билли Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв на диссертацию Мартини Билли Александровны обсужден и одобрен на объединенном семинаре лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики и лаборатории молекулярной иммунологии Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 4 сентября 2023 года (протокол заседания № 1).

Мокроусов Игорь Владиславович д.б.н. 03.00.07 
Заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики
Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Адрес: г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14
Телефон: 8 (812) 644-63-80
Электронная почта: igormokrousov@pasteurorg.ru

Подпись Мокроусова И.В. удостоверяю:

Ученый секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.м.н.


Трифонова Г.Ф.

«11» сентября 2023 г.

