

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Мартини 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

Рассматриваемая диссертация представляет собой исследование активно развивающейся в последние годы темы регуляции адаптации микроорганизмов посредством малых некодирующих РНК к быстроменяющимся условиям. Вследствие тысячелетней коэволюции микобактерий и человека *Mycobacterium tuberculosis* приобрели множество механизмов адаптации и ухода от иммунных реакций организма хозяина. Малые некодирующие РНК составляют самую большую группу регуляторных РНК и играют важную роль во взаимодействиях хозяин-возбудитель. Тем не менее из множества предсказанных регуляторных РНК на сегодняшний момент функционально охарактеризовано лишь 8 малых РНК *M. tuberculosis*, и всего для 4 из них найдены мишени. Актуальность детальной характеристики двух малых РНК Mcr11 и DrrS, обнаруженных только у патогенных микобактерий туберкулезного комплекса, и повышение экспрессии которых показано при инфекции животных и при переходе в покоящееся состояние, не вызывает сомнений, особенно с учетом ежегодно нарастающего числа антибиотико-резистентных штаммов микобактерий, осложняющих борьбу с туберкулезом, и диктующих необходимость поиска новых мишеней для разработки лекарств. Учитывая также тот факт, что экспрессия малых РНК Mcr11 и DrrS увеличивается при переходе в покоящееся состояние, детальная характеристика вовлечения исследуемых малых РНК в регуляцию метаболизма и определение их мишеней, может выявить потенциальные маркеры для диагностики латентного туберкулеза, носителями которого по оценкам ВОЗ являются четверть населения планеты. Кроме того, борьба с латентным туберкулезом, способным к реактивации, на сегодняшний день невозможна вследствие нечувствительности покоящихся форм микобактерий к существующим анти-микобактериальным препаратам. В связи с этим поиск регуляторов, вовлеченных в обеспечение сохранения микобактерий в организме хозяина, а также выявление потенциальных мишеней для диагностики и разработки новых препаратов – крайне достойная задача для исследования.

Из явных плюсов рассматриваемой работы стоит отметить, что изучение вовлечения малых РНК Mcr11 и DrrS во взаимодействие патогена и хозяина проведено практически на всех уровнях – впервые получены и исследованы физиологические особенности

штаммов с делециями исследуемых генов, но также проведено исследование влияния гипер-экспрессии малых РНК. Проведен анализ транскриптомов штаммов микобактерий с гипер-экспрессией, а также $\Delta DrrS$, $\Delta Mcr11c$, $\Delta\Delta Mcr11_DrrS$. Далее, исследован транскриптом макрофагов, инфицированных штаммами микобактерий $\Delta Mcr11$, $\Delta DrrS$ и двойным нокаутом $\Delta\Delta Mcr11_DrrS$, а также проведена оценка влияния штаммов $\Delta Mcr11$, $\Delta DrrS$ и $\Delta\Delta Mcr11_DrrS$ на течение инфекции в модели туберкулеза на мышцах *in vivo*. Использование современных методов молекулярной биологии, биоинформатики и статистики, в сочетании с классическими методами биохимии, микробиологии и культур эукариотических клеток *in vitro* позволили получить огромный массив данных, как, собственно, о новых штаммах микобактерий, так и об их влиянии на ответ макрофагов и течение туберкулезной инфекции.

Стоит также отметить, что изучение транскриптома новых штаммов микобактерий с оверэкспрессией и делециями генов малых РНК проведено отдельно в логарифмической и в стационарной фазах роста микобактерий *in vitro*, что позволяет рассматривать получаемые результаты как возможные проявления при разных течениях туберкулеза – активного, когда размножение микобактерий в организме не подавлено, и латентного, при котором микобактерии находятся в покое в состоянии под четким контролем иммунной системы хозяина. Так, было обнаружено, что для штамма *DrrS-over* большее число дифференциально экспрессированных генов (ДЭГ) в транскриптоме характерно для фазы логарифмического роста, а для обоих мутантных штаммов $\Delta DrrS$ или $\Delta Mcr11$ с делециями генов малых РНК – в стационарной фазе роста. Таким образом, наиболее значимые изменения показаны для генов-регуляторов базовых метаболических процессов, стрессового ответа, ключевого регулятора покоящегося состояния *DosR* и контролируемого им *DosR*-регулона, а также изменение экспрессии генов белков семейств *PE_PGRS* и *PE/PPE*, определяющих вирулентность микобактерий, и в то же время влияющих на иммунный ответ клеток хозяина, а выводы по этому разделу работы убедительны.

При этом, примечательно, что в работе сделан и следующий шаг и проведен анализ транскриптома макрофагов при инфекции полученными штаммами микобактерий $\Delta DrrS$ или $\Delta Mcr11$ *in vitro*. Вывод N4 относительно того, что инфекция костномозговых макрофагов мыши мутантными штаммами *M. tuberculosis* вызывает дисбаланс иммунных реакций макроорганизма выглядит обоснованно. Действительно в данной модели подтверждено, что инфицирование мутантными штаммами привело к изменению профиля экспрессии генов иммунного ответа макрофагов. Интересно также, что если инфекция штаммами с единичными мутациями $\Delta DrrS$ или $\Delta Mcr11$ привела к

изменению экспрессии 32 и 21 генов, соответственно, то инфекция штаммом с двойным нокаутом спровоцировала значительно большие изменения (191 ДЭГ), что позволяет делать предположение о взаимно-дополняющей регуляции малых РНК DrrS и Mcr11. Однако, изменения в экспрессии множества макрофагальных генов, кодирующих про- или противовоспалительные факторы, например, снижение экспрессии генов *nos2*, *tnf*, *il12* и генов, кодирующих белки комплекса МНСII (что совместно способствует выживанию микобактерий), но также *il11*, генов различных металлопротеиназ (что способствует меньшей патологии), свидетельствует о сложной разнонаправленной системе регуляции, и является скорее всего следствием множественных изменений в собственно нокаутированных штаммах. Этот результат сложно однозначно интерпретировать, и необходимо дальнейшее исследование и подтверждение на уровне белков. Кроме того, это наталкивает на мысль, что необходим поиск конкретных мишеней действия исследуемых малых РНК в каскаде реакций. В контексте этих рассуждений мне показался интересным и важным результат, демонстрирующий что после инфицирования мышей штаммы микобактерий с делециями малых РНК Δ Mcr11 и Δ DrrS и двойной нокаут $\Delta\Delta$ Mcr11_DrrS были не способны расти на среде с более высоким содержанием глицерина. В ходе исследования высказано предположение, что DrrS может являться одним из регуляторов метаболизма глицерина у *M. tuberculosis*, а также обнаружена потенциальная мишень связывания малой РНК DrrS – Rv3679, с неопределенной до конца функцией, но находящемся в опероне, кодирующем белковый комплекс с АТФазной активностью. Однако, к сожалению, данный результат не отражен в выводах.

Работа хорошо иллюстрирована, особенно это касается «молекулярно-биологического» раздела, в котором очень подробно и доходчиво описаны все стадии получения генетических конструкций и штаммов с овер-экспрессией и делециями генов малых РНК DrrS и Mcr11, что дает возможность даже не столь сведущему человеку понять принцип и технологию создания новых штаммов микобактерий. В обзоре литературы также охвачены все на мой взгляд требуемые разделы, от описания проблемы патогенеза туберкулеза до роли известных малых РНК в регуляции ответа микобактерий на испытываемый стресс, что позволяет полноценно погрузиться в проблему.

Наряду с высокой оценкой полученных результатов, у меня имеется ряд замечаний. В тексте, к сожалению, встречается довольно много опечаток.

Названия линий мышей в материалах и методах следует приводить полностью, чтобы можно было проследить, где линия поддерживалась. Так, линия мышей I/St из питомника ФГБНУ «ЦНИИТ» называется I/StSnEgYCit.

Кроме того, хочется пожелать, чтобы при описании тех или иных явлений и ссылаясь на данные статей, автор приводил наиболее значимые и/или свежие статьи. Так, например, при описании роли TNF- α при туберкулезе приведены ссылки на не столь значимые статьи 1999 и 2000, тогда как есть исследования в модели туберкулеза на мышцах с кондиционными нокаутами гена *tnfa* в Т-клетках и макрофагах с подробным описанием функций этого цитокина на разных стадиях течения инфекции (например Allie N, et al., 2013).

В русскоязычном тексте принято писать не « γ -ИФН» и «CD4+ Т-клетки», а «Т-клетки CD4⁺» и «ИФН- γ ». Так, фраза «Преимущественно γ -ИФН синтезируется CD4+ Т-лимфоцитами» лучше звучит «Преимущественно ИФН- γ синтезируется Т-лимфоцитами CD4⁺».

По анализу транскриптома штаммов Δ Mcr11 и Δ DrrS сделаны сводные таблицы (Рис. 21 и 22), что позволяет наглядно оценить наиболее значимые изменения. К сожалению, подобного рисунка или таблицы не сделано для результатов анализа транскриптома штаммов с овер-экспрессией генов малых РНК. Приведена лишь таблица с общим числом ДЭГ.

У меня также имеется вопрос:

1. Показано, что штамм *M.tuberculosis* с овер-экспрессией малой РНК DrrS лучше выживает при инфицировании макрофагов линии ТНР-1 (Рис. 4), по сравнению с микобактериями дикого типа. При этом штаммы микобактерий с делециями генов малых РНК DrrS и/или Mcr11 не отличались по выживаемости при инфекции клеток линии ТНР-1 (Рис.19) и КММФ мышей (Рис.27). Как это можно объяснить?

Тем не менее, высказанные замечания не принципиальны, а лишь указывают на то, что научный текст требует внимания не только к смысловому содержанию, но и к его изложению. В целом работа Мартини Билли Александровны выполнена на самом высоком уровне, основные выводы полностью подтверждаются полученными результатами. Применение методов биохимии в сочетании с современными методами молекулярной биологии, RNAseq- и NGS-анализа позволило получить набор уникальных данных о роли малых РНК DrrS и Mcr11 вирулентных микобактерий

M.tuberculosis при взаимодействии патогена с клетками хозяина, что послужит основой для последующих исследований, в том числе, для определения конкретных мишеней исследуемых малых РНК. Результаты диссертационного исследования опубликованы в 5-и статьях в международных научных рецензируемых журналах, а также представлены на отечественных и зарубежных конференциях.

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 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.

ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,
к.б.н. по специальности 14.00.36 «Аллергология и иммунологи»

Линге И.А.



107564 г. Москва, ул Яузская аллея, д.2,
Телефон: 8(499)7859072
Электронная почта: iralinge@gmail.com

Подпись Линге И.А. заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,

К.п.н.

Золотова Н.В.

« 13 » октября 2023 г.

