

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Коноплевой Марии Николаевны
“Механизмы регуляции «quorum sensing» систем первого типа психрофильных
люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei*”, по специальности
03.02.07–«Генетика» на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Диссертационная работа Коноплевой Марии Николаевны посвящена исследованию особенностей механизма регуляции люминесценции у психрофильной морской бактерии *Aliivibrio logei*. Известно, что Quorum Sensing (QS) – это особый тип регуляции экспрессии генов бактерий, зависящий от плотности их популяции. QS системы включают в себя низкомолекулярные сигнальные молекулы – автоиндукторы, а также специальные рецепторные регуляторные белки, с которыми взаимодействуют эти сигнальные молекулы. Сигнальные молекулы автоиндуктора легко проникают через мембрану бактерий. С увеличением плотности бактериальных клеток, увеличивается и достигает некоего порогового значения концентрация автоиндуктора, который начинает связываться с соответствующими регуляторными белками, и такой комплекс включает (или выключает) транскрипцию целого ряда определённых генов. Таким образом, происходит передача информации от одной клетки к соседним, вызывающая скоординированный ответ всей популяции на повышение плотности клеток бактерий. Активное изучение QS систем у различных микроорганизмов в последние годы показало, что они играют важную роль в регуляции целого ряда процессов в бактериальной клетке: в формировании биопленок, в регуляции экспрессии генов связанных с синтезом токсинов, антибиотиков и других метаболитов, а также принимают участие в регуляции вирулентности у патогенных бактерий. Впервые явление «quorum sensing» было описано при исследовании *lux*-оперона у морской люминесцирующей бактерии *Vibrio fischeri*, и именно эта QS система является наиболее хорошо изученной. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый в изучении QS на настоящий момент, многие аспекты функционирования этой системы остаются невыясненными. Таким образом, тема диссертационной работы Коноплевой М. Н. является весьма актуальной. Известно, что ключевым регуляторным элементом QS системы *lux*-оперона является регуляторный белок LuxR. В отличие от исследованной ранее мезофильной морской бактерии *V. fischeri*, у психрофильных люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei* и *A. salmonicidae* (патогенной для атлантического лосося) ген *luxR* представлен в двух копиях.

Основной целью диссертационной работы Коноплевой М. Н. являлось выяснение функциональной роли дубликации *luxR* генов у морских психрофильных бактерий.

В работе Коноплевой М. Н. впервые было показано, что *A. logei* имеет широкий ареал обитания в холодноводных морях России: Охотском, Беринговом, Белом и Балтийском. Так же было получено указание на существование сезонного изменения микрофлоры в кишечном тракте рыб Охотского и Берингова морей. При этом в зимний период психрофильные бактерии *A. logei* с QS регулируемой биолюминесценцией, замещают бактерий с конститутивной биолюминесценцией. При исследовании роли LuxR1 и LuxR2 в QS регуляции *lux*-оперона *A. logei* была показана модуляция ими активности друг друга. Так же было показано, что белок LuxR1 оказывает стабилизирующее влияние на белок LuxR2 в некоторых определённых условиях. Была исследована нуклеотидная структура регуляторной области промоторов Pr1, Pr2 *A. logei* в сравнении с таковой у *A. fischeri* и сделано предположение о причинах различия в силе этих промоторов. Была поставлена и успешно решена прикладная задача по усовершенствованию набора *lux*-биосенсоров для детекции генотоксичных компонентов ракетного топлива. На разработанный набор биосенсоров был получен патент РФ.

Диссертационная работа написана по классической схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 116 страницах, иллюстрирована 34 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 152 наименования.

Во введении представлены актуальность проблемы и цели исследования, отражена научная новизна работы и ее практическая значимость, а также краткое описание методологии и методов исследования.

В главе «Обзор литературы» приведено описание особенностей психрофильных светящихся морских бактерий в сравнении с мезофильными бактериями. Кратко дано описание реакции биолюминесценции и рассмотрена структура организации *lux*-оперонов у представителей разных родов люминесцирующих бактерий. Приведено общее описание системы QS первого типа у различных микроорганизмов и более подробное описание для психрофильных бактерий *A. logei* и *A. salmonicidae*. Отдельная часть обзора литературы посвящена внутриклеточным факторам регуляции экспрессии генов, входящих в опероны QS систем. Так же рассмотрена проблема “фотореактивирующей” способности биолюминесценции. В связи с поставленной в диссертации прикладной задачей дано описание различных методов детекции ракетного топлива (НДМГ) и продуктов его окисления в окружающей среде. В целом, обзор литературы выполнен в очень лаконичном стиле.

Экспериментальная часть работы, начинается с описания материалов и методов исследования (глава 2), значительную часть которого занимают таблицы с перечнем бактериальных штаммов, собранных в 2010 и 2014 годах в Белом, Охотском, Беринговом, Балтийском, Черном и Южно-Китайском морях, а также дополнительных штаммов из других источников, применяемых в диссертационной работе, и таблица с описанием более 20 плазмид, использованных в исследованиях. Генетические, биохимические и биоинформатические методы, применяемые в работе описаны, но в исключительно краткой форме. Результатам и их обсуждению посвящена 3 глава диссертации. Представленные результаты исследования можно условно разделить на 4 части, первая из которых посвящена поиску, сбору и анализу светящихся психрофильных бактерий в Белом, Балтийском, Беринговом и Охотском морях в зимний сезон 2010 и летний сезон 2014 годов. Автором показана разница в видовом составе люминесцентных бактерий, преимущественно заселяющих кишечник рыб в зимний и летний период. У 19 изолированных таким образом штаммов *A. logei* была проанализирована структура *lux*-оперона и было показано, что у всех изолятов присутствуют 2 копии гена *luxR*. Далее было показано, что эти копии имеют значительное различие между собой (менее 60 % идентичности), а значит они могут обладать разными свойствами и выполнять разную функцию. Вторая часть диссертационной работы посвящена сравнительному анализу функциональной активности белков LuxR1 и LuxR2 *A. logei*, их термостабильности, а также изучению вклада LuxR2 в активацию белком LuxR1 промотора Pr1 и вклада LuxR1 в способность LuxR2 активировать экспрессию генов с промотора Pr2. Дополнительно было проведено исследование того, как комбинация белков LuxR1 и LuxR2 влияет на активацию промоторов Pr1 и Pr2 при различных концентрациях добавленного автоиндуктора. Хотелось бы отметить, что все экспериментальные данные были получены только на клетках *E. coli*, содержащих гибридные биосенсорные плазмиды с генами *luxCDABE* *Photorhabdus luminescens* под контролем промотора, регулируемого исследуемым белком *A. logei*, т.е. на модельной системе и, в значительной степени, косвенным методом. Также в ходе работы Коноплевой М. Н. была проанализирована нуклеотидная последовательность *lux*-бокса – места посадки исследуемых регуляторных белков, что позволило автору выдвинуть предположение о том, почему экспрессия с промотора Pr1 в присутствии автоиндуктора идет слабее, чем с Pr2. По-видимому, это связано с тем, что *lux*-бокс Pr1 короче, чем сайт связывания Pr2.

Ранее было показано влияние шаперонина GroEL/ES на фолдинг белка LuxR2 (в отличие от белка LuxR1). В данном диссертационном исследовании было высказано интересное предположение о возможности существования гетеродимерной молекулы типа

LuxR1LuxR2 и изучено влияние шаперонина и Lon-протеазы на интенсивность люминесценции, индуцируемой таким предполагаемым гетеродимером в сравнении с гомодимерами классического типа. Третья часть исследования была связана с изучением влияния биолюминесценции на УФ-чувствительность модельных штаммов *E. coli*, несущих разные варианты гибридных плазмид (гены *lux*-оперонов различных светящихся бактерий, под промоторами QS системы и под УФ-индуцируемыми промоторами). Четвёртая часть исследования была посвящена решению прикладной задачи – разработке нового более чувствительного набора *lux*-биосенсоров для определения токсичных продуктов неполного окисления несимметричного диметилгидразина.

В Заключение резюмированы результаты проведенных исследований.

В целом, работа написана хорошо, однако не лишена некоторых недостатков.

- Описание использованных методов дано очень лаконично, даже слишком. В ряде случаев требуется намного более полное их представление.
- На стр. 50 диссертационной работы утверждается, что «Принадлежность бактерий к указанному виду достоверно подтвердили данные мультигенного секвенирования, люминесцентных характеристик, ключевых биохимических параметров, интервалы температур, определяющие границы роста исследуемых бактерий.» Однако, собственно данные, в работе не представлены.
- Сравнение свойств белков LuxR1 и LuxR2 психрофильной бактерии *A. logei* в большинстве экспериментов проводится со свойствами LuxR из *A. fischeri*, как типичного представителя мезофильных светящихся бактерий. Хорошо было бы привести данные, что используемые свойства LuxR из *A. fischeri* действительно характерны для всех или для подавляющего большинства мезофильных светящихся бактерий.
- Некоторая небрежность в оформлении работы, а именно наличие опечаток, тем более досадных, когда они встречаются в ВЫВОДАХ, так на странице 99 диссертационной работы оказалось пять пунктов выводов, вместо четырёх: п.1, п.2, п.4 и п.5.

Однако высказанные замечания являются минорными и не уменьшают достоинств представленной работы. Работа представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, выполненное на высоком техническом уровне с привлечением различных современных методов, имеющее фундаментальную и практическую значимость.

Положения, выносимые на защиту, соответствуют перечисленным выше темам исследований и являются их кратким заключением. Выводы, сделанные диссертантом, по каждому из разделов работы основаны на обширном экспериментальном материале,

полностью отражают результаты работы и соответствуют поставленным в исследовании задачам.

Автореферат изложен на 27 страницах и полностью отражает содержание диссертации. Полученные результаты опубликованы в 4 печатных работах в рецензируемых журналах из списка ВАК и были представлены на двух конференциях. Получен один патент РФ.

Не вызывает сомнений, что диссертационная работа Коноплевой Марии Николаевны “Механизмы регуляции «quorum sensing» систем первого типа психрофильных люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei*” полностью соответствует критериям, установленным в пунктах 9 и 10 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Коноплева Мария Николаевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика».

02 декабря 2016 г.

Кандидат биологических наук

Берцова Юлия Васильевна

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Научно-исследовательский институт
физико-химический биологии имени А.Н. Белозерского
Web-сайт организации: belozersky.msu.ru

Должность: Старший научный сотрудник отдела
Молекулярной энергетики микроорганизмов
НИИ физико-химический биологии имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова
Адрес: 119992 Москва, Ленинские горы, д.1, стр.40
e-mail: bertsova@genebee.msu.ru
Тел: +7 (495) 930 00 86

ПОДПИСЬ
Зав. канцелярией