

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Коноплевой Марии Николаевны
«Механизмы регуляции «Quorum Sensing» системы первого типа психрофильных
люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei*» по специальности 03.02.07 – «Генетика»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

Диссертационная работа Коноплевой М.Н. является продолжением многолетних исследований, проводимых в Лаборатории генетики бактерий ФГБУ «ГосНИИГенетика», по изучению Quorum Sensing (QS) регуляции у люминесцирующих бактерий и генетики процесса биолуминесценции. Она посвящена изучению организации и экспрессии QS систем у психрофильных люминесцирующих бактерий, интереснейшей группы бактерий, у которых этот вопрос исследован крайне мало.

Тематика диссертационной работы и полученные в ней результаты, несомненно, актуальны. В фундаментальном отношении актуальность работы М.Н. Коноплевой связана с изучением генетических основ психрофилии бактерий, механизмов их холодоустойчивости, генетики и биохимии психрофилии. Изучение этих вопросов существенно и для использования бактерий-психрофилов и их ферментов в биотехнологии. Вторым важным аспектом – это изучение регуляции биолуминесценции, процесса – загадки, биологическая и эволюционная значимость которой до сих пор до конца не определены и вызывают в настоящее время большой общебиологический интерес и серьезные споры исследователей различных специальностей. Третий аспект, определяющий актуальность тематики диссертации – изучение особенностей QS систем психрофилов, которые могут быть использованы как природные регуляторы экспрессии генов, значимых для биотехнологии. Диссертантом получены новые, приоритетные данные при исследовании всех этих вопросов. И, наконец, актуальность диссертационной работы непосредственно в прикладном отношении – это разработка на основе полученных конструкций новых сенсоров с *lux*-репортером для обнаружения генотоксичных продуктов в среде, что имеет важное значение для экологии.

Диссертация М.Н. Коноплевой имеет нормальный для кандидатских диссертаций объем и количество иллюстративных материалов, она изложена на 116 страницах, содержит 34 рисунка и 9 таблиц. Список цитируемой литературы включает 152 источника, в том числе, более 20 работ сотрудников Лаборатории генетики бактерий.

Диссертация построена традиционно, она состоит из разделов Введение, в котором четко очерчены предистория и постановка задач работы; Обзора литературы, Экспериментальной части, включающей Материалы и методы исследования, результатов и обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы.

Обзор литературы состоит из нескольких разделов. В первом разделе приводятся данные о психрофильных люминесцирующих морских бактериях, условиях их обитания в природе, их физиолого-биохимических особенностях, определяющих перспективы их применения в биотехнологии. Следующий раздел, названный «Генетический контроль биолюминесценции бактерий» с несколькими подразделами включает данные о реакции биолюминесценции, сравнительные данные об организации *lux*-оперонов у светящихся бактерий, сведения о системах QS первого типа, сигнальных молекулах N-ацил-гомосеринлактонах (АГЛ) и их взаимодействии с рецепторными белками. Кроме того, в обзоре приведены имеющиеся литературные данные о клеточных факторах, участвующих в регуляции экспрессии генов QS оперонов; существенную роль в этом направлении исследований играют работы сотрудников Лаборатории. Интересный, мало известный аспект изучения биолюминесценции описан в разделе «Фотореактивирующая способность биолюминесценции». И, наконец, последний раздел обзора посвящен прикладной задаче, поставленной в диссертации – обсуждены предпосылки создания *lux*-биосенсоров для определения токсичных компонентов ракетного топлива. Обзор, как и вся диссертация, легко и с интересом читается. Знакомство с обзором показывает, что автор хорошо знает литературу по рассматриваемому вопросу, умеет анализировать литературные данные. Обзор содержит полный объем литературных данных, необходимых для выполнения запланированных исследований.

Содержание раздела «Материалы и методы» свидетельствует о высоком методическом уровне работы, выполненной с применением многих современных генетических, молекулярно-генетических и микробиологических методов: метод выделения и сохранения светящихся психрофильных бактерий, генно-инженерные методы, ПЦР, секвенирование ДНК, биоинформационный анализ с построением филогенетических деревьев.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких разделов. Диссертантом получено большое количество приоритетных результатов, представляющих несомненный научный интерес. Не перечисляя все данные автора, отмечу наиболее, на мой взгляд, значимые.

Очень интересен в генетико-экологическом плане раздел «Филогенетический анализ психрофильных бактерий». Были выделены в нескольких холодных морях (Белое,

Балтийское, Берингово, Охотское моря) и идентифицированы 45 штаммов светящихся бактерий, относящихся к *Aliivibrio logei*, *Photobacterium* sp., и в теплых морях (Черное, Южно-Китайское моря) 9 штаммов светящихся бактерий, относящихся к *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio aquamarines*. Из других источников были получены также штаммы *A. fischeri*, *A. salmonicida* и *Photorhabdus luminescens*. Было отмечено широкое распространение бактерий *A. logei* в акваториях холодных морей, окружающих Россию. Заслуживает внимания обнаруженный диссертантом не случайный, по-видимому, факт, что психрофильные светящиеся бактерии, обитающие в студеных морях, часто могут составлять основную популяцию кишечной микрофлоры, что позволяет предполагать существенную роль биолуминесценции для бактерий в этих условиях. Диссертантом была проведена большая работа по построению филогенетических деревьев этих бактерий на основе генов 16S РНК. Был впервые обнаружен интересный факт, что в связи с сезонными колебаниями температур в поверхностных слоях Охотского и Берингова морей летом бактерии *Photobacterium* sp. (свободно живущие) замещают бактерии *A. logei* (симбионты животных), которые преобладают зимой; при этом оба рода бактерий относятся к психрофилам. Это преимущество *A. logei* над *Photobacterium* sp. в условиях низких зимних температур автор связывает с тем, что *A. logei* имеет QS систему, а у бактерий *Photobacterium* sp. она отсутствует.

Ранее было показано, что в составе кластера генов, ответственных за QS регуляцию у *A. logei* и родственного ему вида *A. salmonicida*, присутствуют две копии гена *luxR*, кодирующего регуляторный рецепторный белок LuxR, с которым связывается сигнальная молекула АГЛ. Такая организация была характерна только для психрофилов и не наблюдалась у мезофилов. Известно, что дупликация генов часто наблюдается в геномах психрофилов, это приводит к увеличению экспрессии кодируемого ими белка и может повышать устойчивость бактерий к низким температурам. В диссертационной работе было показано, что подобная организация *lux*-кластера наблюдалась у всех изученных штаммов *A. logei*, независимо от того, в каком море они были выделены, т.е. это был очень устойчивый признак, постоянный при миграции бактерий на большие расстояния. Было неясно, отличаются ли гены *luxR1* и *luxR2* по функциональной роли, или присутствие этих двух генов является только результатом дупликации генов. На основании проведенного диссертантом биоинформационного анализа с построением филогенетических деревьев генов *luxR1*, *luxR2* разных штаммов этих двух видов *Aliivibrio* было определено, что последовательности генов *luxR1* и *luxR2* образуют два обособленных кластера, что свидетельствует в пользу предположения о разной функции этих генов.

Принципиально важные результаты были получены диссертантом при исследовании функциональной роли и значимости LuxR1 и LuxR2 белков в QS системе регуляции *A. logei* с использованием различных методических подходов; были показаны существенные различия этих белков. Следует отметить, что эти исследования проводились очень основательно – было сконструировано много плазмид, мульти- и малокопийных, несущих репортерные *lux*-опероны и промоторы *lux* генов из разных бактерий. В результате было показано, что экспрессия генов *lux*-оперона *A. logei* идет значительно слабее с промотора Pr1, чем с промотора Pr2. Это различие, как вполне обоснованно предполагает автор, может быть связано с тем, что *lux*-бокс в промоторной области Pr1 короче, чем *lux*-бокс в промоторе Pr2 и поэтому определяет менее эффективное взаимодействие с белком LuxR1. Конечно, было бы интересно проверить эту гипотезу, изменив *lux*-бокс; не исключено, что более слабая экспрессия с промотора Pr1 обусловлена структурными различиями белков LuxR1 и LuxR2.

В серии экспериментов диссертантом был исследован вопрос о том, могут ли белки LuxR1 и LuxR2 взаимодействовать друг с другом и регулировать активность друг друга при активации Pr1 и Pr2 промоторов. Были обнаружены довольно сложные отношения этих регуляторных белков. Показано, например, что при высоких концентрациях аутоиндуктора белок LuxR1 стабилизирует основной регулятор белок LuxR2 в клетках с активной Lon протеазой и в клетках, мутантных по шаперонину GroEL/ES. Выдвинута оригинальная гипотеза участия гомодимеров и гетеродимеров белков LuxR1 и LuxR2 в активации экспрессии *lux*-оперона.

Интерес представляет также раздел работы, в котором исследовалось влияние биолюминесценции на чувствительность клеток *E. coli*, содержащих *lux*-опероны различных светящихся бактерий, к УФ-облучению. Рассмотрение этого вопроса имеет отношение к выяснению функциональной роли биолюминесценции в клетках бактерий. М.Н. Коноплевой было показано, что присутствие в клетках плазмиды с полным *lux*-опероном, определяющим активную биолюминесценцию, увеличивает резистентность клеток к УФ в два раза, т.е. в принципе *lux*-опероны, введенные в клетки, способны активировать фотозащиту от УФ-повреждений ДНК. Однако эффект этот очень невелик и, по мнению диссертанта, вряд ли играет существенную роль в природных условиях.

В последней части работы приведены полученные диссертантом данные, важные в прикладном отношении – был разработан набор высоко чувствительных *lux*-биосенсоров, который был предложен для определения содержания в среде генотоксичных, в том числе, алкилирующих продуктов неполного окисления несимметричного диметил

гидразина. Следует отметить, что эти биосенсоры могут быть использованы и для обнаружения других токсичных соединений.

Полученные экспериментальные данные обстоятельно обсуждены в тексте главы «Результаты и обсуждение» и в «Заключении».

Положения, выносимые на защиту, соответствуют перечисленным выше направлениям исследований и являются их кратким заключением.

Диссертационная работа вызывает некоторые замечания, в основном, по оформлению диссертации. Описаны выделение и характеристика 54 штаммов светящихся бактерий из кишечника рыб, выловленных в акваториях различных студеной морей. Кажется мало вероятным, что все эти бактерии были выделены и охарактеризованы только диссертантом. Если это не так, следовало бы указать, что это была совместная работа, в которой участвовали... , что никак не упустило бы значимость работы диссертанта.

Имеются неточные, жаргонные выражения, например, «вирулентные гены» вместо «генов вирулентности»; «дикий штамм» вместо «штамм дикого типа» и др. Встречаются непонятные, непроверенные фразы. В подписи к рис. 32 (рис. 14 в автореферате) биосенсор MG1655 pOxyS-lux назван MG1655 pOxyR-lux.

Эти небольшие замечания не снижают, конечно, общего положительного впечатления от диссертации.

Оценивая работу в целом, можно сделать заключение, что диссертационная работа М.Н. Коноплевой заслуживает высокой оценки. В ней получены новые оригинальные данные, представляющие несомненный научный интерес. Достоверность и новизна полученных результатов не вызывают сомнений. Выводы, представленные в диссертации, непосредственно вытекают из ее содержания, соответствующего специальности «Генетика», по которой диссертационная работа М.Н. Коноплевой представлена к защите. Автореферат диссертации полностью соответствует полученным экспериментальным данным и содержит основные положения диссертации. Результаты, представленные в работе, опубликованы в четырех статьях, из них две в международных журналах; имеется также патент РФ.

Рецензируемая работа вносит ощутимый вклад в фундаментальные исследования регуляции экспрессии генов микроорганизмов, а именно, глобальных регуляторов QS систем регуляции, в понимание особенностей регуляции клеточных процессов психрофильных бактерий. Большое значение для практики имеют полученные диссертантом новые lux-биосенсоры для определения токсичных веществ в окружающей среде. Содержащиеся в диссертации сведения и заключения, несомненно, интересны и

полезны для исследователей, работающих в области генетики, молекулярной генетики микроорганизмов, биотехнологии, как в фундаментальном плане, так и в прикладных направлениях. Полученные диссертантом результаты могут быть использованы в вузах для подготовки специалистов в области генетики бактерий.

Диссертационная работа М.Н. Коноплевой «Механизмы регуляции «Quorum Sensing» системы первого типа психрофильных люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei*» является научно-квалификационной работой, соответствующей критериям, установленным п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. По актуальности, объему исследований, высокому методическому уровню, приоритетности полученных результатов, научной значимости она полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика, а ее автор Коноплева Мария Николаевна, несомненно, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной генетики Российской академии наук.
Заведующая Лабораторией регуляции экспрессии генов микроорганизмов.

Адрес: Москва 123182, пл. Курчатова 2

www.img.ras.ru

Тел. 8 499 196 00 16

Эл. почта: khmel@img.ras.ru

доктор биологических наук, профессор

Хмель Инесса Александровна

2.12.2016

Подпись И.А. Хмель удостоверяю.

Ученый секретарь ИМГ РАН

кандидат биологических наук

Андреева Л. Е.

