



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

05.12.2016

№ 12307-2171-1089

На № 38-1

от 26.10.2016



«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по научной
работе ФИЦ Биотехнологии РАН д.б.н.,
профессор Н.В. Равин

02.12.2016г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕ

о научно-практической ценности диссертации
Коноплевой Марии Николаевны
«Механизмы регуляции «quorum sensing» системы первого типа психрофильных
люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 – «Генетика»

1. Актуальность избранной темы диссертационного исследования

Исследование генетических основ регуляции систем межклеточной передачи сигналов между бактериальными клетками («quorum sensing», QS) важно для понимания механизмов адаптации организма к изменяющимся условиям среды на популяционном уровне, а также имеет большую значимость в сельскохозяйственных и медико-биологических отраслях, поскольку активность вирулентных генов патогенов, способность к образованию биопленок, устойчивость к медицинским препаратам зачастую регулируются QS системами.

Для данных целей представители психрофильных люминесцирующих бактерий вида *Aliivibrio logei* являются удобными модельными объектами. QS система у этих бактерий контролирует активность люциферазного *lux*-оперона, активируя его экспрессию и «включая» люминесценцию при высокой концентрации клеток. Особенностью QS системы *Aliivibrio logei*, является более сложный механизм генетической регуляции, что определяется наличием не одного (как в большинстве аналогичных систем), а двух генов *luxR*, кодирующих LuxR регуляторы *lux*-оперона. Хотя наличие двух различных регуляторов у *Aliivibrio logei* было, значимость этого яв-

ления и роль каждого из регуляторов оставались неизвестными. В этой связи представляется актуальным исследование функциональной роли каждого из LuxR регуляторов QS системы.

В соответствии с поставленной целью в работе можно выделить несколько взаимосвязанных частей. На первом этапе М.Н. Коноплевой был проведен поиск, сбор и молекулярно-филогенетический анализ бактерий, обитающих в Белом, Охотском, Беринговом, Балтийском морях, люминесценция у которых регулируется QS системой первого типа. Поиск новых регуляторных QS систем микроорганизмов представляет большой интерес. Далее была проведена серия экспериментов по выявлению особенностей в регуляции QS системы первого типа психрофильных бактерий, а именно, установлению функциональной роли каждого из двух LuxR регуляторов в различных условиях, которые могут реализовываться в ходе жизненного цикла бактерии. Отдельным разделом работы М.Н. Коноплевой является изучение способности люминесцирующих бактерий индуцировать фотолиазу за счёт свечения и возможной роли QS системы в фотозащите от УФ-повреждений ДНК. Областью практического применения люминесцирующих бактерий и их *lux*-оперонов является создание дюциферазных биосенсорных систем для экологического мониторинга. В этой связи заключительный этап диссертационного исследования М.Н. Коноплевой представлен разработкой цельноклеточных *lux*-биосенсоров для мониторинга загрязнения окружающей среды токсичными производными несимметричного диметил гидразина (НДМГ).

Таким образом, проведенные автором исследования решают актуальные научные и практические задачи в области генетики бактерий, молекулярной биологии и экологической биотехнологии.

2. Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научную новизну диссертационной работы определяют следующие результаты исследования, впервые полученные соискателем.

В ходе исследовательской работы показан были получены новые изоляты люминесцирующих психрофильных бактерий вида *A. logei* из Охотского, Берингова, Балтийского и Белого моря.

Определена функциональная роль каждого из *luxR1* и *luxR2* генов в QS регуляции *lux*-оперона *A. logei*, показана модуляция ими активности друг друга. Определена роль АТФ – зависимых шаперонов и протеаз в активации *lux*-оперона QS системой *A. logei*.

На модели штаммов *Escherichia coli* мутантных по эксцизионной репарации показано, что биолюминесценция приводит к индукции фотолиазы и в определенных условиях может обеспечивать защиту от последующих индуцируемых ультрафиолетом повреждений ДНК.

Разработан новый набор *lux*-биосенсоров для контроля над содержанием токсичных, в том числе алкилирующих, продуктов неполного окисления НДМГ в окружающей среде.

3. Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов

Теоретическая ценность полученных результатов в диссертационной работе состоит в расширении понимания механизмов функционирования QS систем у бактерий. Важными являются сведения о необходимости для *A. logei* второго регуляторного гена *luxR1* для ответа QS системы на наличие АИ в среде, в случае если клетки находятся в стрессовых условиях при недостатке шаперонов и/или избытке протеаз.

Практическая значимость работы, подтвержденная выдачей патента РФ на изобретение, состоит в разработке набора новых люциферазных биосенсоров для экологического мониторинга.

4. Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты диссертационной работы М.Н. Коноплевой могут быть использованы в научной работе организациями, проводящими исследования в области генетики микроорганизмов, при реализации учебных образовательных программ высшего профессионального образования по направлению генетика, молекулярная биология, микробиология, биотехнология. Полученные данные могут быть использованы в дальнейших молекулярно-генетических исследованиях по реклассификации различных штаммов светящихся психрофильных бактерий *A. logei* и *A. salmonicida*.

Предлагаемый в диссертационной работе набор биосенсоров может быть рекомендован для использования подразделениями Роскосмоса для быстрой детекции в полевых условиях уровня загрязнения окружающей среды токсичными компонентами ракетного топлива.

5. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Для достижения цели исследования были поставлены адекватные задачи, которые удалось полностью решить с использованием широкого набора современных и классических физико-химических, микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования.

Применение этих методов позволило автору получить новые данные о механизмах регуляции «quorum sensing» системы первого типа психрофильных люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei*, изучить активность и термостабильность психрофильных регуляторных белков LuxR1 и LuxR2 и исследовать влияние внутриклеточных факторов Lon-протеазы и шаперонина GroEL/ES на активность регуляторных белков LuxR1 и LuxR2, и их комбинацию, а также провести оценку влияния QS-регулируемых *lux*-оперонов на УФ-чувствительность бактерий. Достоверность этих результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментов и оценкой погрешности измерений.

Часть новых изолированных штаммов светящихся психрофильных бактерий, собранных в акваториях Охотского, Берингова, Балтийского, Белого морей депонированы на хранение в Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов.

Для определения токсичных продуктов неполного окисления НДМГ в диссертационной работе предложена новая группа биосенсоров, обладающих большей чувствительностью к малым концентрациям токсикантов, чем применяемые ранее биосенсоры. Научно-практическая значимость рукописи не вызывает сомнений.

6. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Структура диссертационной работы М.Н. Коноплевой стандартна и состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, включающей описание Материалов и Методов, изложения и обсуждения результатов исследования, Заключение, Выводов, Списка цитируемой литературы (152 источника).

Обзор литературы, представленный в работе, достаточно полно освещает вопросы, касающиеся темы исследования. В обзоре рассмотрены состояние современной классификации светящихся бактерий, особенности генетического контроля бактериальной биolumинесценции, влияние внутриклеточных факторов на регуляции экспрессии генов *lux*-оперонов, а также методы и подходы в использовании *lux*-оперонов для определения токсичных веществ, в т.ч. НДМГ..

В главе Материалы и методы исследования методики описаны достаточно подробно, что позволяет воспроизвести их. Применяемые методы адекватны поставленным задачам исследования. Работа проведена на современном методическом уровне с использованием различных методов генетической инженерии, биохимии и молекулярной генетики.

Приведенные в работе научные положения, выводы и рекомендации аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

В целом, диссертация Коноплевой М.Н. является законченным научным исследованием, выполненном на высоком экспериментальном уровне и отличающимся новизной и актуальностью.

Отмечая достоинства диссертационной работы, ее практическую значимость и научную новизну, следует указать на некоторые спорные положения и высказать замечания.

1. Прежде всего необходимо отметить не вполне корректную формулировку первого вывода работы о том, что «Психрофильные бактерии вида *A. logei*, обладающие QS системой первого типа, широко распространены в акваториях студеной морей России (Белое, Охотское, Берингово, Балтийское), при этом бактерии *Photobacterium sp.* в летний период доминируют над

бактериями *A. logei*, преобладающими в зимний сезон при низких температурах». Обычно под «доминированием» в экологии микроорганизмов понимают большую численность одной группы бактерий по сравнению с другой. Но в работе не проводилось определение состава микробных сообществ морской воды, стандартным методом которого является молекулярный анализ последовательностей генов 16S рРНК. Получены лишь данные о том, что из кишечника рыб в летний период преимущественно выделяется *Photobacterium*, а в зимний - *A. logei*. Но сделать из этого заключения о численности этих бактерий в морской воде нельзя. Также необоснованными являются утверждения автора о том, что психрофильные светящиеся бактерии могут составлять до 70% микробиома кишечника рыб. Для этого нужны молекулярные исследования. На стр. 53 диссертации присутствует странная фраза о том, что «скорость миграции бактерий в северных морях происходит быстрее, чем мутагенез вариабельной области luxR1-luxC». Видимо речь шла о генетической структуре популяции.

2. В диссертации недостаточное внимание уделено вопросам специфичности разработанного биосенсора на НДМГ. Дело в том, что для создания этих сенсоров использован набор бактериальных промоторов (PalkA, Poxys, Psoxs, PcolD, PgrpE), индуцирующихся в ответ на стрессовые факторы широкой специфичности такие как алкилирование ДНК, окислительный стресс, повреждения ДНК и т.п.. Такие эффекты может вызывать не только НДМГ через продукты своего окисления, но и множество других токсикантов, что может стать предметом дальнейших исследований. Это замечание носит дискуссионный характер.

3. Также в работе присутствуют опечатки и редакционные погрешности. Например, список выводов в диссертации не содержит пункта 3. Список литературы не приведен к единому формату и содержит опечатки.

Высказанные замечания, однако, не касаются основного результата диссертационной работы, определяющего ее новизну и научную значимость – установлению роли двух регуляторов люциферазного оперона у *A. logei*. Поэтому высказанные замечания не снижают общей высокой положительной оценки работы.

7. Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат соответствует содержанию диссертации.

8. Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные положения диссертации нашли отражение в публикациях автора, в том числе две статьи в журналах из списка ВАК, две статьи в международных журналах высокого уровня, а также в докладах на научных конференциях. Получен патент РФ на изобретение.

9. Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

По уровню научной значимости полученных результатов, по их новизне и оригинальности диссертационная работа Коноплевой М.Н. «Механизмы регуляции «quorum sensing» системы первого типа психрофильных люминесцирующих бактерий *Aliivibrio logei*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Коноплева Мария Николаевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «Генетика».

Заключение рассмотрено и одобрено на совместном семинаре лаборатории систем молекулярного клонирования, лаборатории молекулярной диагностики и группы геномики микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН, протокол № 1 от 01 декабря 2016 г.

Ведущий научный сотрудник,
Руководитель группы геномики микроорганизмов
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
доктор биологических наук

А.В.Марданов

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2
Тел. +7 (495) 954 52 83, факс. +7 (495) 954 27 32
E-mail: inbi@inbi.ras.ru
web-site: <http://fbras.ru>

